Quantitative und qualitative Analyse der Transkription CcpA-regulierter Gene

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

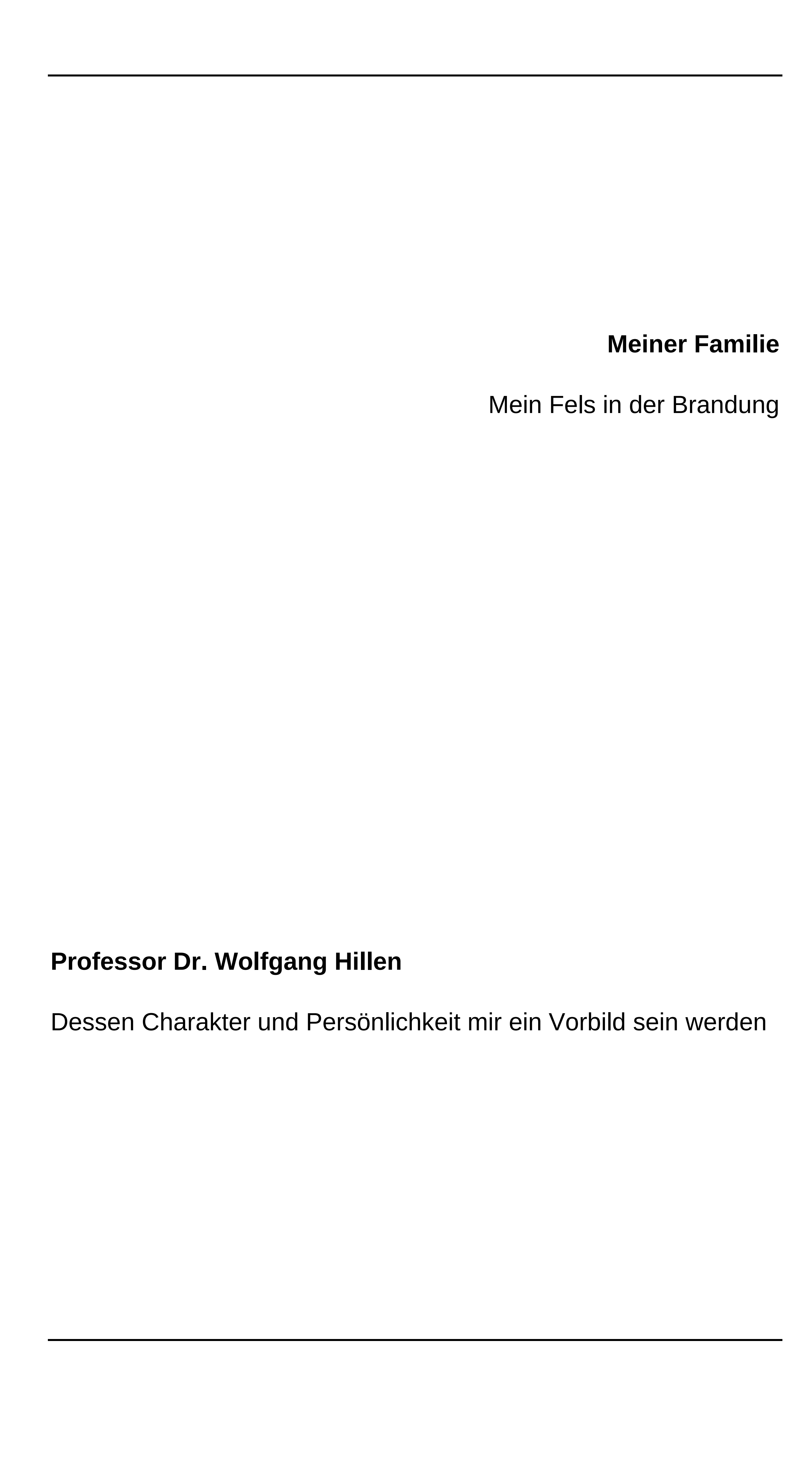
vorgelegt von

Nadine Steinert

aus Niederwiesa

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung:	27.03.2012
Vorsitzender der Prüfungskommission:	Prof. Dr. Rainer Fink
Erstberichterstatter:	Prof. Dr. Andreas Burkovski
Zweitberichterstatter:	Prof. Dr. Jörg Stülke



Meiner Familie

Mein Fels in der Brandung

Professor Dr. Wolfgang Hillen

Dessen Charakter und Persönlichkeit mir ein Vorbild sein werden

Danksagung

Prof. Dr. Wolfgang Hillen möchte ich für die Möglichkeit der Promotion an diesem Lehrstuhl danken. Er stand stets für fachliche Unterstützung und kritische, zugleich motivierende Diskussionen zur Verfügung. Es ist immer noch unfassbar, dass er diese Zeilen niemals lesen wird.

Prof. Dr. Andreas Burkovski danke ich dafür, dass er mich Promotions-Waise nach dem 17.10.2010 aufgenommen hat.

Bei **Prof. Dr. Jörg Stülke** bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Gerald Seidel, der die Betreuung der CcpA-Gruppe quasi über Nacht übernehmen musste, danke ich für die immerwährende und unermüdliche, wenn auch manchmal nervenaufreibende Unterstützung und den Antrieb, immer noch ein klein bisschen besser zu werden.

Den letzten Besatzern der CcpA-Bastion, **Maike**, **Andrea** und **Maria**, danke ich von ganzem Herzen für die Begleitung all die Jahre. Mit euch habe ich gelacht, geweint, geflucht, resigniert und doch immer wieder neue Kraft und frischen Mut gewonnen. **Maike** danke ich besonders, dass sie trotz unzähliger Androhungen letztendlich nie etwas nach mir geworfen hat. **Maria** danke ich für leckeres Essen und die Freuden griechischer Flüche. **Andrea**, danke besonders für die letzten Wochen. Wir waren uns letztendlich doch ähnlicher als gedacht.

Ein herzlicher Dank geht an **Katrin**, meine Weggefährtin auf den Spuren der real-time qPCR.

Allen **jetzigen und ehemaligen Mitgliedern** der Mibi möchte ich für die stete Hilfsbereitschaft und lockere Arbeitsatmosphäre danken. Ein besonderer Dank geht an die helfenden Hände des Lehrstuhls, Frau Wehr, Herr Rösch, Gerald, Manu, Anja und Markus Müller. Ohne euch würde hier rein gar nichts laufen.

Didi danke ich ganz herzlich für die gemeinsame Zeit, die Starthilfe, den Kampf mit den Protoplasten, die Schokischublade und die gemeinsamen Kickerabende.

Danke auch an die **„Galileo“-Runde** für wunderbare Abende voller erheiternder und erhellender Gespräche inmitten einer Schar Cocktailgläser.

Meinen **Bachelorstudenten Lorenz**, **Christoph** und **Inga** danke ich für die Mithilfe an meiner Forschung und besonders Inga für die regelmäßigen Lachkrämpfe bei ihren Erzählungen.

Der größte Dank gilt meiner **Familie**: danke für unendlich viel Trost, Unterstützung, Rückendeckung und Verständnis. Danke für einen Glauben an mich, an dem man Stahl verbiegen könnte. Danke, dass kein Tiefschlag diese Familie je erschüttern kann.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung

Der zentrale Regulator der Kohlenstoffkatabolitenregulation (KKR), das Katabolitkontrollprotein A (CcpA), reguliert etwa 10 % aller Gene in *B. subtilis*, welche neben dem Kohlenstoffmetabolismus auch in den Überflussstoffwechsel, den Stickstoff- und Phosphatmetabolismus sowie die Aminosäuresynthese involviert sind (Fujita, 2009). Um ein quantitatives Verständnis dieses weitreichenden Regulationsnetzwerks zu entwickeln, soll im Rahmen des Systembiologie-Projekts BaCell-SysMO bereits determinierte kinetische Daten der Protein-Komponenten der KKR mit der Transkriptbildungsrate in Abhängigkeit der CcpA-vermittelten Regulation vernetzt werden. Dafür wurde im ersten Schritt eine Methode für die absolute Quantifizierung der intrazellulären Transkriptkonzentration auf Basis der quantitativen real-time PCR entwickelt. Diese ermöglicht die akkurate mRNA-Quantifizierung beim Übergang zu physiologischem Stress. Die Validierung der Methodik erfolgte quantitativ mittels β-Galaktosidase-Aktivitätsmessungen und qualitativ mittels RNA-Hybridisierungs-experimenten. Anschließend erfolgte die Optimierung der Wachstumsbedingungen von *B. subtilis* in Minimalmedium ohne Aminosäurezugabe auf die maximale Wuchsrate. Unter diesen Kultivierungsbedingungen wurden mittels zeitaufgelöster Quantifizierung der Transkriptkonzentration die Rate der Akkumulierung (Summe aus Transkriptauf- und abbau) und des Abbaus der CcpA-regulierten Gene *xylA* und *xynP* ermittelt. Daraus berechnete sich die Transkriptbildungsrate, welche als Kenngröße für die Reaktion der Zelle auf die (De-)Aktivierung der KKR definiert ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die *alsS*-Expression in KKR-defizienten *B. subtilis*-Mutanten in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle analysiert. Anschließend wurde erörtert, über welche Wege die CcpA-abhängige Aktivierung der Expression des *alsSD*-Operons funktionieren könnte.

2 Einleitung

2.1 Der Modellorganismus *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis ist ein Vertreter der apathogenen Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt der DNA (Stülke & Hillen, 2000). Durch die phylogenetische Nähe zu pathogenen Vertretern der Bazillen (Alcaraz *et al.*, 2010) sowie Staphylokokken, Listerien, Clostridien und Mykoplasmen dient er als Modellorganismus für die medizinische und molekularbiologische Forschung. Die ubiquitäre Verbreitung von *B. subtilis* hauptsächlich in den oberen Bodenschichten (Balkwill *et al.*, 1997) erfordert ein hohes Maß an Adaption an verschiedenste Lebensbedingungen. Hierzu variiert die Zelle die Genexpression und damit das Proteom (Stülke & Hillen, 2000). Die Anpassung an Stress- und Hungersituationen hat zur Ausbildung vieler Strategien geführt, wie z.B. die Bildung von Endosporen gegen Hitze, Trockenheit oder Nährstoffmangel (Driks, 2002; Losick *et al.*, 1986; Piggot & Hilbert, 2004), die Produktion antibiotisch wirksamer Peptide als Standortvorteil (Kleerebezem, 2004; Kleerebezem *et al.*, 2004; Lee & Kim, 2011; Stein, 2005; Tsuge *et al.*, 2001) sowie die Exkretion von Exoenzymen zur Erschließung zusätzlicher Kohlenstoffquellen (Priest, 1977; Stülke & Hillen, 2000). Letztere Eigenschaften machen *B. subtilis* für den industriellen Einsatz besonders interessant. Die strikte Regulation der Genexpression kataboler Enzyme in Abhängigkeit der verfügbaren Kohlenstoffquelle ist einer der wichtigsten Adaptionsmechanismen und wird als Kohlenstoffkatabolitenregulation (KKR) bezeichnet (Brückner & Titgemeyer, 2002; Deutscher *et al.*, 2006; Deutscher, 2008; Fujita, 2009; Gunnewijk *et al.*, 2001; Stülke & Hillen, 1999; Stülke & Hillen, 2000; Warner & Lolkema, 2003). Dieser Regulationsmechanismus ist mit dem zentralen Zuckeraufnahmesystem von *B. subtilis*, dem Phosphotransferasesystem, eng vernetzt. Daher wird dieses Transportsystem im Folgenden kurz erläutert.

2.2 Das Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferasesystem

Die Aufnahme vieler bevorzugter Kohlenstoffquellen wie Glukose, Fruktose, Mannose, Saccharose und Mannitol wird durch das Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferasesystem (PTS) gesteuert (Postma *et al.*, 1993; Reizer *et al.*, 1999; Saier & Reizer, 1994; Titgemeyer & Hillen, 2002). Dieser Mechanismus basiert auf dem Transfer eines Phosphatrests von Phosphoenolpyruvat über die generellen PTS-Komponenten Enzym I (EI) und HPr (Histidine containing protein) auf das zuckerspezifische Enzym II (EII) (siehe Abb. 2.1). Der EII-Komplex besteht aus den zytoplasmatischen Domänen A und B und den membranständigen Domänen C bzw. D (Postma *et al.*, 1993; Saier & Reizer, 1992). Über die Phosphorylierung durch EII wird das Zuckermolekül in die Zelle geschleust und steht zur weiteren Verstoffwechslung zur Verfügung. Eine Vernetzung des PTS mit der Kohlenstoffkatabolitenregulation (KKR) in *B. subtilis* erfolgt über die Position der Phosphorylierung des HPr. Dieser globale Regulationsmechanismus wird im folgenden Abschnitt dargestellt.

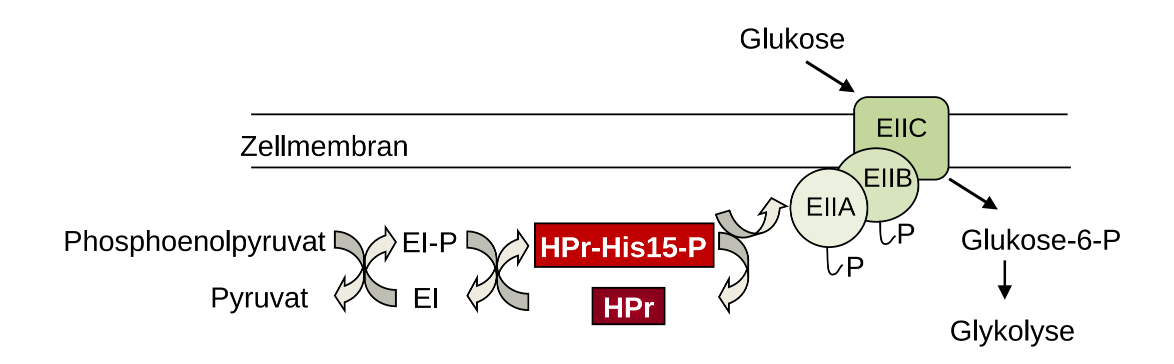


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des PTS-Systems am Beispiel von Glukose (nach Lorca *et al.*, 2005). Ein Phosphatrest wird, ausgehend von Phosphoenolpyruvat, über EI auf den Histidinrest 15 von HPr übertragen. HPrHis15P phosphoryliert den membranständigen zuckerspezifischen EII-Komplex, der den Phosphatrest auf das Zuckermolekül transferiert und dieses damit in die Zelle schleust.

2.3 Kohlenstoffkatabolitenregulation in *Bacillus subtilis*

Die Kohlenstoffkatabolitenregulation (KKR) steuert die Verwertung der zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquellen, um der Zelle das schnellste Wachstum zu ermöglichen (Görke & Stülke, 2008). Hierzu wird die Expression der Gene, deren Genprodukte die Verstoffwechslung sekundärer Kohlenstoffquellen katalysieren, reprimiert (Deutscher, 2008; Sonenshein, 2007; Stülke & Hillen, 2000). Bei Wachstum auf einer energiereichen und schnell zu verstoffwechselnden Kohlenstoffquelle wie Glukose wird die Expression der Proteine für den Überflussstoffwechsel durch die KKR aktiviert (Shivers *et al.*, 2006; Stülke & Hillen, 2000). Der zentrale Regulator für die KKR in *B. subtilis* ist das Katabolitkontrollprotein A (CcpA) (Fujita, 2009; Henkin, 1996; Hueck *et al.*, 1994; Hueck & Hillen, 1995; Stülke & Hillen, 2000; Titgemeyer & Hillen, 2002). CcpA reguliert etwa 10 % aller Gene, welche in zentrale physiologische Prozesse wie den Kohlenstoff- und den Phosphatmetabolismus, den Aminosäureanabolismus und die Sporulation involviert sind (Blencke *et al.*, 2003; Lorca *et al.*, 2005; Lulko *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2001; Tobisch *et al.*, 1999). Sobald eine bevorzugte Kohlenstoffquelle vorhanden ist, aktiviert die daraus resultierende hohe Konzentration an Fruktose-1,6-biphosphat (FBP) sowie ATP die HPr-Kinase/Phosphorylase (HPrK/P) (Jault *et al.*, 2000; Nessler *et al.*, 2003). Dieses Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Phosphorylierung der Koeffektoren HPr bzw. Crh (catabolite repression HPr) am jeweiligen Serinrest 46 (Favier *et al.*, 2002; Galinier *et al.*, 1998; Lavergne *et al.*, 2002; Mijakovic *et al.*, 2002; Nessler *et al.*, 2003; Poncet *et al.*, 2004; Reizer *et al.*, 1998). Je zwei Moleküle HPrSer46P bzw. CrhSer46P binden an CcpA und bilden so den aktivierten Komplex. Dieser kann nun mit der Erkennungssequenz *cre* (catabolite responsive element) der DNA interagieren und die Transkription der stromabwärts gelegenen Gene regulieren (Aung-Hilbrich *et al.*, 2002; Schumacher *et al.*, 2004; Schumacher

et al., 2006; Seidel *et al.*, 2005) (Abb. 2.2). Im Folgenden werden die zentralen Komponenten der KKR in *B. subtilis* näher charakterisiert.

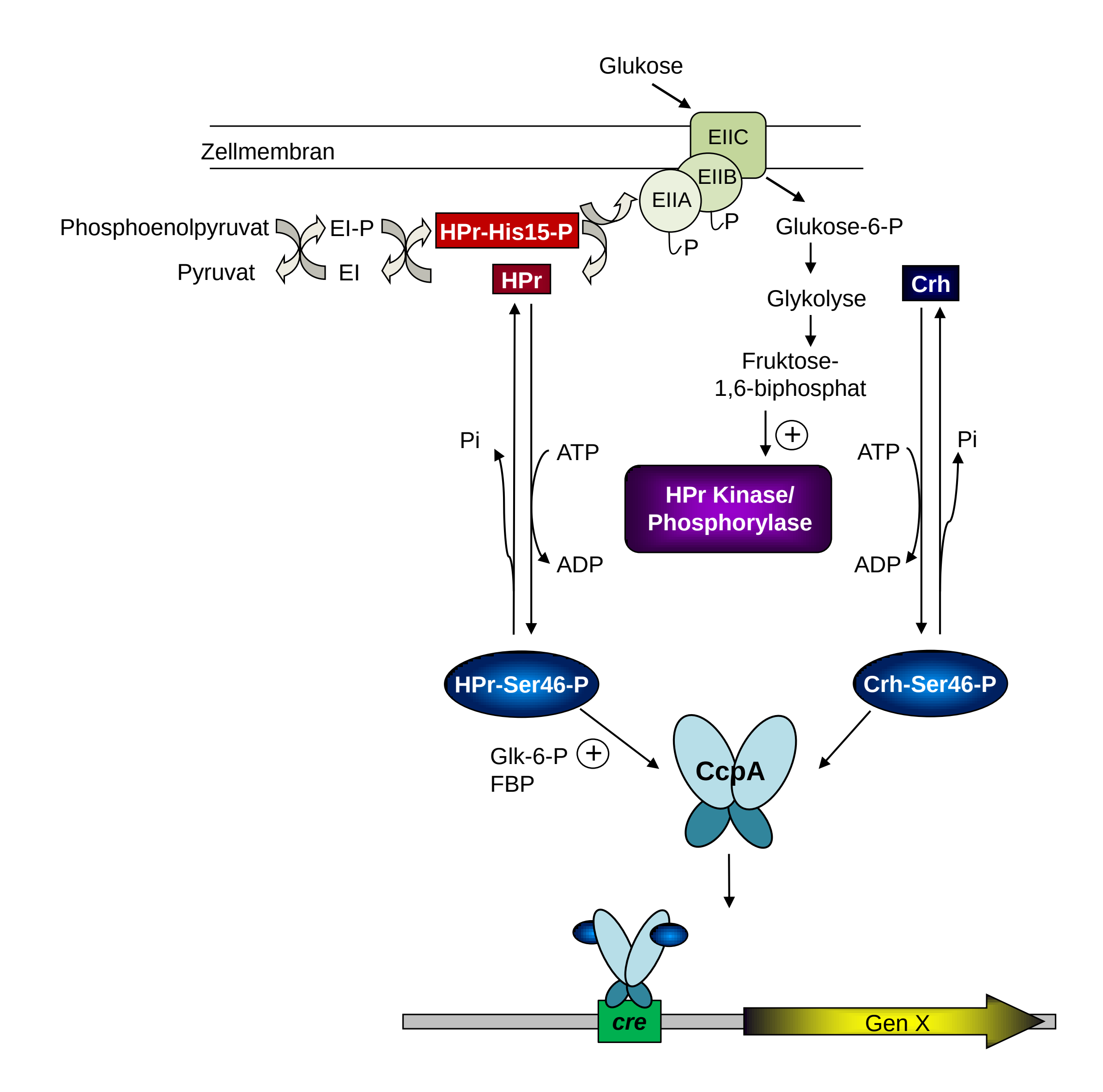


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Kohlenstoffkatabolitenregulation und des PTS-Systems (beispielhaft für Glukose) in *B. subtilis* (nach Lorca *et al.*, 2005). Der Zucker wird über das PTS-System in die Zelle geschleust. Ein hoher FBP-Spiegel stimuliert die Phosphorylierung von HPr und Crh am Serin 46, sodass diese Koeffektoren an das CcpA-Dimer binden. Der aktivierte CcpA-Komplex interagiert mit spezifischen Bindemotiven der DNA, den *cre*-Sequenzen, und reguliert die Transkription der stromabwärts gelegenen Gene.

2.3.1 Die zentralen Komponenten der KKR: CcpA – HPr und Crh – Glukose-6-P und FBP

Die Auflösung der Kristallstrukturen der Komplexe CcpA-HPrSer46P-*cre* (Schumacher *et al.*, 2004) und CcpA-CrhSer46P-*cre* (Schumacher *et al.*, 2006) ermöglichten Einblicke in den Aufbau und die Funktionalität von CcpA. Der Transkriptionsregulator gehört zur LacI/GalR-Familie und agiert als Dimer (Weickert & Adhya, 1992). Die Bindung von CcpA an die *cre* wird durch die Bindung von HPrSer46P bzw. CrhSer46P stimuliert (Schumacher *et al.*, 2004; Schumacher *et al.*, 2006; Seidel *et al.*, 2005). Dabei wird eine allosterische Konformationsänderung von der DNA-ungebundenen in die DNA-bindende Form induziert (Schumacher *et al.*, 2004; Schumacher *et al.*, 2006). Die Bindung von HPrSer46P an CcpA wird durch die Wechselwirkung des CcpA mit den niedermolekularen Kofaktoren Glukose-6-P (Glk-6-P) und FBP unterstützt (Seidel *et al.*, 2005). Die Kofaktoren binden im Effektorbindespalt des CcpA und stabilisieren so die DNA-bindende Konformation des aktivierten CcpA-Komplexes (Schumacher *et al.*, 2007). Kinetische Studien der Protein-Protein-Interaktionen der KKR zeigten eine sehr schnelle Bindung von HPrSer46P an CcpA und resultierend daraus eine zügige Interaktion des CcpA-HPrSer46P-Komplexes mit der *xylA-cre* (Seidel *et al.*, 2005). Ebenso erfolgt eine rasche Auflösung des CcpA-HPrSer46P-*cre*-Komplexes bedingt durch die schnelle Dissoziation von HPrSer46P aus dem Komplex (Seidel *et al.*, 2005).

2.3.2 Die Bindungssequenz *cre*

Die Bindung des aktivierten CcpA-Komplexes an die DNA erfolgt an der spezifischen Operatorsequenz *cre*. Die große Flexibilität des Helix-Turn-Helix Motivs der DNA-Bindedomäne ermöglicht CcpA dabei die Interaktion mit unterschiedlichen *cre*-Sequenzen (Tab. 2.1). Die Repression durch CcpA wird an *cre*-Sequenzen vermittelt, welche stromabwärts des Promotors

lokalisiert sind oder diesen überlappen (z.B. *amyE* (Kim *et al.*, 2005)). Die stromabwärts gelegenen *cre*-Sequenzen können sich im 5'-untranslatierten Bereich (z.B. *xynP* (Galinier *et al.*, 1999), hut_{cre2} (Wray *et al.*, 1994)) oder im Strukturgen (z.B. *xylA* (Jacob *et al.*, 1991)) befinden. Eine Aktivierung der Transkription durch CcpA wurde beispielsweise für die Gene *ackA* (Henkin, 1996; Moir-Blais *et al.*, 2001), *pta* (Presecan-Siedel *et al.*, 1999) und das *ilv-leu*-Operon (Shivers & Sonenshein, 2005; Tojo *et al.*, 2005) gezeigt, deren *cre*-Sequenzen jeweils stromaufwärts des Promotors lokalisiert sind. In den nächsten beiden Kapiteln werden die CcpA-abhängige Aktivierung am Beispiel von *alsS* und die CcpA-vermittelte Repression anhand der Gene *xynP* und *xylA* näher erläutert.

Tab. 2.1: Vergleich der bekannten *cre*-Konsensussequenzen

Referenz	Konsensussequenz (5' → 3')
Miwa & Fujita, 2001	WT**G**NAAR**CG**Y**TT**WWN
Weickert & Chambliss, 1990	T**G**WNAN**CG**NTNW**C**A
Hueck *et al.*, 1994	W**G**NAAS**CG**NWWN**C**A
Miwa *et al.*, 2000	WWT**G**NAAR**CG**NWWW**C**AWW

Konservierte Regionen sind fett gedruckt

W: A/T R: G/A S: C/G Y: C/T N: A/C/G/T

2.3.3 CcpA-abhängige Aktivierung am Beispiel der *alsS*-Expression

Die Umwandlung von Pyruvat in den Überflussmetaboliten Acetoin wird von den Enzymen Acetolactat-Synthase (*alsS*) und Acetolactat-Decarboxylase (*alsD*) katalysiert, deren Gene in einem Operon organisiert sind (Renna *et al.*, 1993). Wächst *B. subtilis* auf einer primären Kohlenstoffquelle wie Glukose, so kommt es aufgrund des schnellen Stoffwechsels zur Anhäufung von Pyruvat, welches den intrazellulären pH absenkt. Um diese

Übersäuerung zu verhindern, wird der Überflussmetabolismus aktiviert, welcher Pyruvat hauptsächlich in Acetat umwandelt (Tännler *et al.*, 2008; Tobisch *et al.*, 1999). Die Bildung von Acetoin spielt bei exponentiellem aerobem Wachstum eine untergeordnete Rolle (Schilling *et al.*, 2007; Speck & Freese, 1973). Die Expression der dafür benötigten Gene ist bei anaerobem Wachstum um das Zwanzigfache erhöht (Reents *et al.*, 2006). Die Expression des *alsSD*-Operons wird genspezifisch durch den Transkriptionsaktivator AlsR gesteuert (Renna *et al.*, 1993) (Abb. 2.3). Der Induktor für die AlsR-Aktivität ist bisher nicht zweifelsfrei identifiziert. Promotoraktivitätsstudien zeigten einen induzierenden Effekt durch Acetat bei Wachstum in Minimalmedium, jedoch nur in Anwesenheit von Glukose (Asrat, 2008; Renna *et al.*, 1993). Das *alsSD*-Operon besitzt keine *cre* entsprechend der Konsensussequenz (Lorca *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2001). Jedoch ist in *ccpA*-Deletionsstämmen (Horstmann, 2006; Lulko *et al.*, 2007; Schlottmann, 2009; Sprehe, 2007; Turinsky *et al.*, 2000) und in Stämmen mit *ccpA*-Punktmutationen (Horstmann, 2006; Sprehe, 2003; Sprehe, 2007; Turinsky *et al.*, 2000) eine fehlende Aktivierung der *alsS*-Expression zu beobachten. Dieser indirekte Einfluss der KKR auf die Expression des *alsSD*-Operons ist bisher unbekannt.

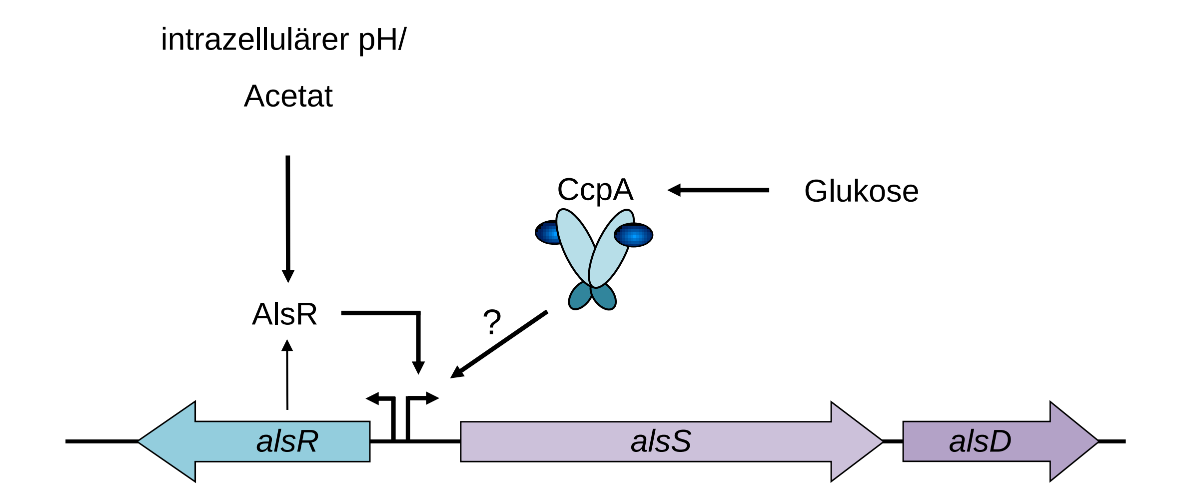


Abb. 2.3: Schema der Regulation des *alsSD*-Operons in *B. subtilis*. Die Expression wird durch AlsR aktiviert. Als Induktor für den Transkriptionsaktivator wird Acetat vermutet. Die Deletion von CcpA verhindert eine Glukose-abhängige Aktivierung der Transkription, jedoch ist der Mechanismus nicht geklärt, da *alsS* keine *cre* aufweist.

2.3.4 CcpA-vermittelte Repression am Beispiel von *xynP* und *xylA*

Die Verwertung der sekundären Kohlenstoffquelle Xylan bzw. Xylose wird durch die Genprodukte der Operons *xynPB* sowie *xylAB* vermittelt (Abb. 2.4). Die Repression von *xynP* (kodiert für Xylosidtransporter) und *xylA* (kodiert für Xylose-Isomerase) erfolgt genspezifisch über den Xyl-Repressor XylR, welcher bei Abwesenheit von Xylose an den Xyl-Operator *xylO* bindet (Gärtner *et al.*, 1988; Gärtner *et al.*, 1992; Lindner *et al.*, 1994). In Gegenwart von Xylose wird die Expression der Gene induziert (Gärtner *et al.*, 1988; Lindner *et al.*, 1994). Weiterhin unterliegen die Gene der globalen CcpA-vermittelten Regulation, die bei Anwesenheit einer bevorzugten Kohlenstoffquelle wie Glukose die Expression der Gene reprimiert (Galinier *et al.*, 1999; Kraus *et al.*, 1994). Zusätzlich zur Glukose-abhängigen Repression mittels der KKR ist ein Anti-Induktor-Effekt von Glukose-6-P auf XylR bekannt (Dahl *et al.*, 1995). Dieser verhindert die Derepression der betreffenden Gene selbst in Anwesenheit des Induktors Xylose, wenn der Energiespiegel der Zelle hoch ist.

Der molekulare Mechanismus der CcpA-abhängigen Regulation ist qualitativ gut erforscht, dennoch gibt es bezüglich der quantitativen Zusammenhänge der beteiligten Komponenten sowie der kinetischen Aspekte der KKR bisher nur wenige Informationen (Seidel *et al.*, 2005). Im Rahmen einer systembiologischen Betrachtung der komplexen KKR soll eine quantitative Analyse der KKR neue Erkenntnisse bringen. Das entsprechende Projekt BaCell-SysMO wird im folgenden Kapitel vorgestellt.

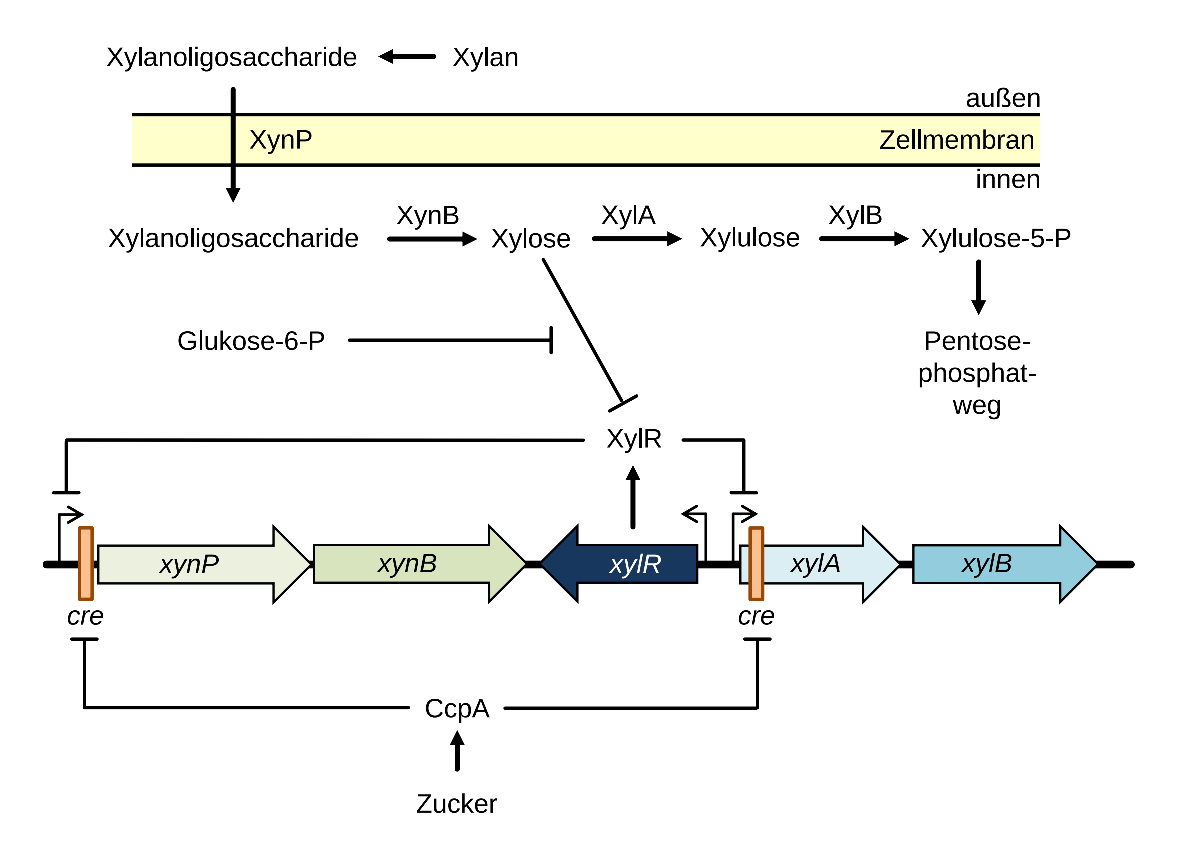


Abb. 2.4: Verwertung von Xylan in *B. subtilis* (nach Singh *et al.*, 2008). Xylan wird durch extrazelluläre Xylanasen in Xylanoligosaccharide abgebaut und über den Xylosidtransporter XynP in die Zelle aufgenommen. Die β-Xylosidase XynB zerlegt diese Oligosaccharide in Xylose, welches mittels der Xylose-Isomerase XylA und Xylulokinase XylB in Xylulose-5-P umgewandelt wird. Diese kann dann über den Pentosephosphatweg verstoffwechselt werden. Die für diesen Abbauweg benötigten Enzyme sind in den Operons *xynPB* und *xylAB* kodiert, welche bei Abwesenheit des Induktors Xylose durch den Xyl-Repressor XylR reprimiert werden. Diese Gene unterliegen der KKR, indem der aktivierte CcpA-Komplex die Transkription durch Bindung an die stromabwärts gelegene *cre*-Sequenz blockiert. Zusätzlich wirkt Glukose-6-P als Anti-Induktor für XylR und verstärkt die Glukose-abhängige Repression der Operons.

2.4 Systembiologische Untersuchung komplexer Regulationsmechanismen in BaCell-SysMO

Die Systembiologie, ein relativ junges Feld der Biologie, legt das Hauptaugenmerk auf die gesamtheitliche Betrachtung von Einzelzellen bis hin zu Organismen. Das Ziel ist das Verständnis der komplexen

dynamischen Interaktionen in und zwischen Zellen, Organen und Organismen und die Vorhersage der Lebensvorgänge (Kitano, 2002; Spivey, 2004). Dazu werden moderne Techniken der Biologie wie die „-omics“-Technologien mit mathematischen Analysen verknüpft, um komplexe dynamische Computermodelle zu erstellen (Kitano, 2002) (Abb. 2.5). Diese wiederum ermöglichen die Vorhersage biologischer Prozesse, was besonders für die Biotechnologie und die medizinische Forschung von großem Interesse ist (Bakker *et al.*, 2010; Bumann, 2009; Burgess-Herbert & Euling, 2011; de Lorenzo, 2008; Peng *et al.*, 2009; Pritchard & Birch, 2011; Stites & Ravichandran, 2009; Tan *et al.*, 2007; Teusink *et al.*, 2010; Triggle, 2007; Wendisch *et al.*, 2006).

Das transnationale Systembiologie-Projekt “Systems Biology of Microorganisms” (SysMO) ist eines der größten und umfangreichsten Programme. Das Ziel ist die quantitative Bestimmung und Vernetzung der intrazellulären Prozesse in Mikroorganismen auf molekularer Ebene und die Entwicklung von dynamischen Computermodellen zur Beschreibung der komplexen Systeme (Booth, 2007). Dafür wurde bereits die Internet-Plattform SEEK für die Bereitstellung und den gruppenübergreifenden Austausch von Daten entwickelt (Wolstencroft *et al.*, 2011). Die Projekte beschäftigen sich unter anderem mit der Anpassung an physiologische Stressbedingungen, welche ein umfangreiches Netzwerk an regulatorischen Systemen erfordert.

Das Teilprojekt BaCell-SysMO untersucht spezifisch die intrazellulären Prozesse in *B. subtilis* während des Übergangs von Wachstum auf Glukose zu Glukosehunger. Hierbei spielt die Kohlenstoffkatabolitenregulation eine zentrale Rolle. Bisherige Studien untersuchten die Kinetik der Komplexbildung der Protein-Komponenten der KKR sowie der Bindung des Komplexes an die DNA (Seidel *et al.*, 2005). Mithilfe des systembiologischen Ansatzes von BaCell-SysMO sollen die bisherigen quantitativen Erkenntnisse der kinetischen und thermodynamischen Aspekte der Protein-Interaktionen um neue Parameter erweitert werden. Das Ziel ist eine computergestützte Simulation der KKR, um ein tiefgreifendes quantitatives Verständnis dieses komplexen Regulons zu gewinnen. Essentiell hierfür ist die Frage, wie

schnell die Zelle als Reaktion auf die Änderung der Glukoseverfügbarkeit die Transkription der Zielgene beeinflusst. Dazu ist eine akkurate quantitative Untersuchung der Transkriptbildung notwendig, welche mittels der sensitiven quantitativen PCR ermöglicht wird.

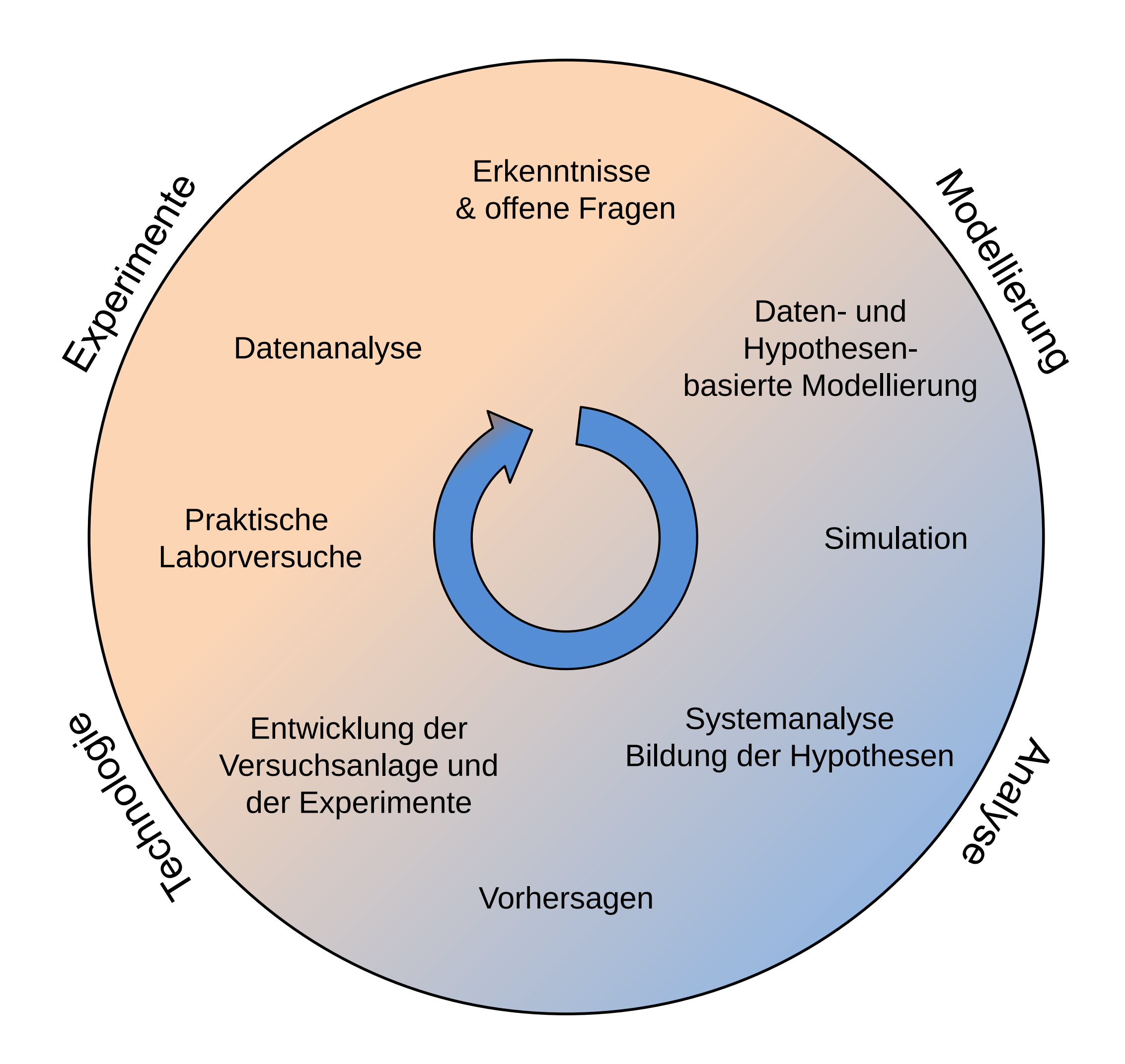


Abb. 2.5: Hypothesen-basierte Forschung in der Systembiologie (nach Kitano, 2002). Bereits gewonnene Erkenntnisse führen zur Entwicklung von Modellen, welche die Bildung weiterer Hypothesen möglich machen. Diese werden anschließend mit Hilfe von Experimenten untersucht. Dabei führen diese Beobachtungen zur Verfeinerung oder Widerlegung des bestehenden Modells. Dieser idealisierte Kreislauf führt letztendlich zur möglichst genauen Beschreibung der dynamischen Prozesse der Zelle, des Organs oder des Organismus.

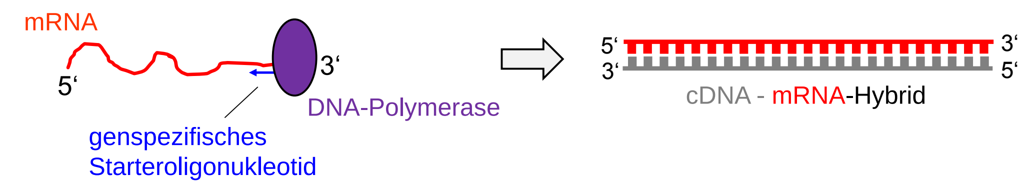
2.5 Quantifizierung von mRNA mittels quantitativer real-time PCR

Die Verwendung der real-time PCR für die quantitative Analyse von Nukleinsäuren stieg in den letzten 25 Jahren rapide an (VanGuilder *et al.*, 2008). In Kombination mit der Reversen Transkription (RT) ermöglicht die real-time PCR die quantitative Analyse der Genexpression in Pro- und Eukaryoten, indem der messenger RNA (mRNA)-Spiegel des Templats erfasst wird (Nolan *et al.*, 2006; Wong & Medrano, 2005). Nachfolgend soll ein Überblick über die quantitative PCR (qPCR) gegeben werden.

Der Nachweis von mRNA erfordert die Reverse Transkription der mRNA in cDNA. Dies geschieht überwiegend mittels „Random Hexamer“-Oligonukleotiden oder unspezifischen Oligo(dT)-Oligonukleotiden. Weitaus seltener werden genspezifische Starteroligonukleotide dafür eingesetzt, da sie nicht die simultane Detektion mehrerer spezifischer Transkripte in der Gesamt-RNA ermöglichen. Die für die RT eingesetzten RNA-abhängigen DNA-Polymerasen besitzen keine RNase H-Aktivität mehr, die zu einem Zerfall des mRNA-cDNA-Hybridmoleküls führen würde (Schultz & Champoux, 2008). Damit entspricht ein mRNA-Molekül einer doppelsträngigen Hybrid-Matrize in der qPCR. Die anschließende quantitative PCR basiert auf der Echtzeit-Detektion der Vervielfältigung der Matrize. Dies geschieht mittels unspezifischer DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. SYBR® Green oder markierter Produkt-spezifischer Sonden (Arya *et al.*, 2005; Buh Gasparic *et al.*, 2010). Während des exponentiellen Anstiegs der Fluoreszenz korreliert diese direkt mit der Zunahme der Ziel-DNA. Der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, wird als Quantifizierungszyklus C_q bezeichnet (Bustin *et al.*, 2009). Je niedriger dieser Wert ist, desto mehr Matrize stand in der PCR-Reaktion zu Beginn zur Verfügung (Abb. 2.6).

Die hohe Sensitivität der Methodik hat zur Folge, dass viele Faktoren die Zuverlässigkeit der Analyse entscheidend beeinflussen, wie z.B. die Qualität der Zielmatrize, die Spezifität der Oligonukleotide sowie die Interpretation der gewonnenen Daten (Bustin & Nolan, 2004; Bustin *et al.*, 2009).

Die Spezifität der Oligonukleotide ebenso wie die effiziente Bindung an die Matrize sind Kerngrößen einer erfolgreichen qPCR. Bei Verwendung von unspezifisch an die DNA bindenden Fluoreszenzmarkern (SYBR® Green) ist die Spezifität der Nachweisreaktion allein von den verwendeten Oligonukleotiden abhängig. Sie kann durch Schmelzkurvenanalyse des entstandenen PCR-Produkts sowie mittels Gelelektrophorese überprüft werden. Die effiziente Bindung an die DNA ist maßgeblich für die exakte Quantifizierung der mRNA verantwortlich, da unzureichende Amplifizierung zu einer Unterquantifizierung führen kann. Bei einer optimalen PCR-Reaktion verdoppelt sich die Zahl der Produkte pro Zyklus, was einer Effizienz von 100 % entspricht. Liegt die Effizienz (E) deutlich niedriger, ist die PCR-Reaktion unzureichend optimiert. Eine Effizienz von deutlich über 100 % ist ein Zeichen für die Amplifizierung von unspezifischen Nebenprodukten. Die Effizienz wird mithilfe einer Standardkurve ermittelt, die den linearen Zusammenhang zwischen eingesetzter Matrizenmenge (Gesamt-RNA, Plasmid oder auch genomische DNA) und detektiertem Quantifizierungszyklus C_q herstellt. Eine hohe Linearität ist essentiell für eine zuverlässige Quantifizierung über mehrere Größenordnungen hinweg. Zusammen mit dem Quantifizierungszyklus C_q stellt die Effizienz E und die Linearität der Standardkurve die wichtigsten Kenngrößen für ein optimiertes RT-qPCR-System dar.



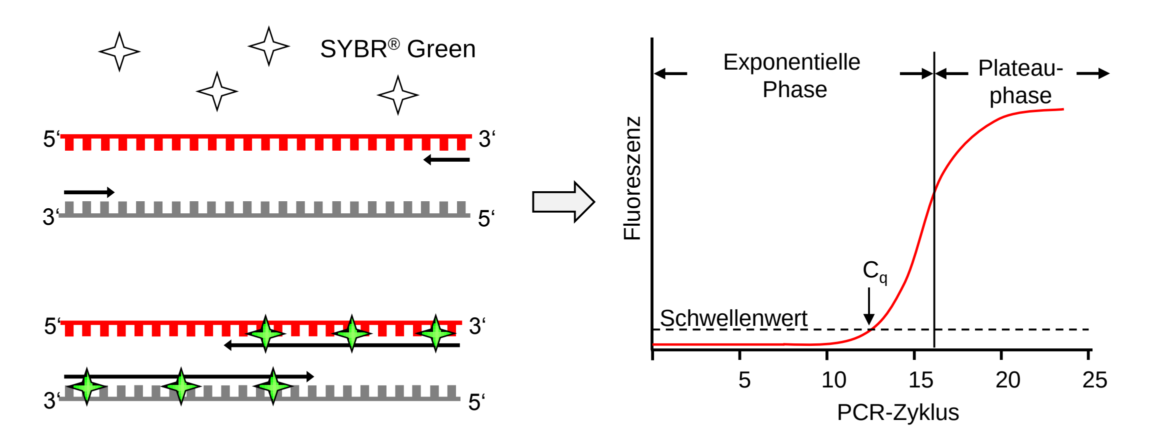


Abb. 2.6: Schematische Darstellung der RT-qPCR. Die in die Reaktion eingesetzte Gesamt-RNA enthält bis 5 % mRNA. Die mRNA des Zielgens (rot) wird mit Hilfe eines genspezifischen cDNA-Oligonukleotids (blau) und einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (violett) in cDNA umgeschrieben. Dabei entsteht je mRNA ein doppelsträngiges Hybridmolekül (rot-grau), welches als Matrize der quantitativen real-time PCR dient. Während der real-time PCR lagert sich SYBR® Green an die entstehenden doppelsträngigen PCR-Produkte an und erzeugt ein Fluoreszenzsignal. Aus der daraus entstehenden exponentiellen Fluoreszenzkurve kann der Quantifizierungszyklus C_q bestimmt werden, der als Schnittpunkt der Kurve mit dem Schwellenwert der Hintergrundfluoreszenz definiert ist.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Die KKR in *B. subtilis* ist qualitativ bereits gut erforscht. Bisherige Studien untersuchten die Kinetik der Protein-Komponenten der CcpA-abhängigen Regulation. Die Reaktion der Zelle auf das An- bzw. Abschalten der Regulation, die Rate der Transkriptbildung, ist bis dato jedoch nicht quantitativ betrachtet worden. Ziel des ersten Projekts dieser Arbeit war daher die Entwicklung und Validierung eines Messsystems für die quantitative Bestimmung der intrazellulären Transkriptkonzentrationen in *B. subtilis* beim Übergang zu physiologischem Stress. Anschließend soll exemplarisch für KKR-regulierte Gene die Kinetik des Transkriptauf- und abbaus von *xylA* und *xynP* untersucht werden. Diese Daten sollen in naher Zukunft als Parameter eines dynamischen Computermodells der KKR im Rahmen des BaCell-SysMO-Projekts verarbeitet werden.

Im zweiten Projekt sollte die CcpA-abhängige Aktivierung der *alsS*-Expression näher charakterisiert werden. Das Gen besitzt keine *cre*-Sequenz, zeigt in Abwesenheit von CcpA jedoch keine Aktivierung. Anhand der *alsS*-Expression in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle soll ein möglicher Einfluss des Zuckertransportsystems auf die Regulation untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Tab. 3.1: Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche, Penzberg, Deutschland
Agar	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agarose	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumeisen(III)-citrat (CAF)	Sigma, München, Deutschland
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin (Amp)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Arabinose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Blocking Reagenz	Roche, Penzberg, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Casein, säurehydrolysiert (CAA)	Gibco/BRL, Karlsruhe, Deutschland
Chloramphenicol (Cm)	Sigma, München, Deutschland
desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTPs)	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Diethylcarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eisen(III)-chlorid	Sigma, München, Deutschland
Erythromycin (Erm)	Sigma, München, Deutschland
Ethanol, absolut (EtOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fruktose	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Glukonat	Sigma, München, Deutschland
Glukose (Glk)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutaminsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glyzerin (Glycerol)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Guanidinthiocyanat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Oxoid, Heidelberg, Deutschland
Isoleucin	Sigma, München, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydroxid (Plätzchen)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin (Km)	Sigma, München, Deutschland
Kobaltchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kupferchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Leucin	Sigma, München, Deutschland
Lugolsche Lösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Manganchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mangansulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mannitol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mannose	Sigma, München, Deutschland
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methionin	Sigma, München, Deutschland
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
tri-Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
di-Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-N-Lauroylsarkosinat	Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriummolybdat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumsuccinat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nukleotidtriphosphate	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Nutrient Broth	Oxoid, Heidelberg, Deutschland
o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid (ONPG)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Polyethylenglycol 6000	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rifampicin	Merck, Darmstadt, Deutschland
RNase AWAY®	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sorbit	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Spermidin	Sigma, München, Deutschland
Stärke	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff (flüssig)	Linde, Höllkriegelskreuth, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma, München, Deutschland
Trypton	Oxoid, Heidelberg, Deutschland
L-Tryptophan	Sigma, München, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Valin	Sigma, München, Deutschland
Wasser „Baker HPLC analyzed“	J.T. Baker, Griesheim, Deutschland
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
D(+)-Xylose (Xyl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zinkchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure	Sigma, München, Deutschland

3.1.2 Geräte

Tab. 3.2: Geräte

Gerät	**Bezugsquelle**
Autoklav Systec 5075	EL Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus Christ, Osterode, Deutschland
Biofuge primo R	Heraeus Christ, Osterode, Deutschland
ChemiDoc XRS	Bio-Rad, München, Deutschland
Dispensor	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Einhängethermostat	Julabo, Seelbach, Deutschland
Feinwaage Sartorius Analytic	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophoreseapparaturen	M. Müller, FAU Erlangen-Nürnberg, Deutschland
Heizblock Dri Block DB3	Techne, England
Horizontalschüttler 3006	New Brunswick, Neu Isenburg, Deutschland
Hybridisierungsofen Hybridiser HB-1D	Techne, England
Kulturschüttler G25	New Brunswick, Neu Isenburg, Deutschland
Magnet-Heizrührer RTC basic	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Milli-Q© PF Plus	Millipore, Eschborn, Deutschland
Mikroliterpipetten	Gilson, Düsseldorf, Deutschland
Mikrowellengerät	Micromat AEG, Frankfurt/M., Deutschland
MyiQ 2 Real-time PCR-System	Bio-Rad, München, Deutschland
Nanodrop ND1000 Spektrometer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
PerfectBlue Gelsystem	Peqlab, Erlangen, Deutschland
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin, Deutschland
Pipette Eppendorf Reference	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Precellys 24 Homogenisator	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Schüttelwasserbad innova 3100	New Brunswick, Neu Isenburg, Deutschland

Spannungsgerät	Heinzinger, Rosenheim, Deutschland
Spektralphotometer Novaspec III	GE Healthcare, München, Deutschland
Thermocycler primus 96	PeqLab, Erlangen, Deutschland
UV Schirm 366 nm	Vetter, Wiesloch, Deutschland
UV-Stratalinker 1800	Stratagene, Heidelberg, Germany
Vakuumblotter S&S Minifold I	Schleicher&Schüll, Dassel, Germany
Vakuumzentrifuge (Speed-Vac)	Heraeus Christ, Osterode, Deutschland
Vortexer	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Waage Sartorius universal	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad EcoTemp	Julabo, Seelbach, Deutschland

3.1.3 Proteine, Enzyme und Antikörper

Tab. 3.3: Proteine; Enzyme, Antikörper

Enzyme, Proteine, Antikörper	**Bezugsquelle**
Anti-Digoxygenin-AP (Anti-DIG-AP)	Roche, Penzberg, Deutschland
Lysozym	Serva, Heidelberg, Deutschland
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland
Protector RNase-Inhibitor	Roche, Penzberg, Deutschland
Quick T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland
Ribonuklease A	Sigma, München, Deutschland
Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP)	Roche, Penzberg, Deutschland
T7 RNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland

3.1.4 Kits und Reaktionsmixe

Tab. 3.4: Kommerzielle Kits und Reaktionsmischungen

Kit-Bezeichnung	Bezugsquelle	Anwendung
CSPD	Roche, Penzberg, Deutschland	Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase
DIG RNA Labeling Mix	Roche, Penzberg, Deutschland	Digoxygenin-Markierung der RNA-Sonden
DNase Set, RNase-free	Qiagen, Hilden, Deutschland	Restriktion genomischer DNA während der RNA-Präparation
illustra MicroSpin™ G-50 columns	GE Healthcare, München, Deutschland	Aufreinigung Digoxygenin-markierter RNA-Sonden
iScript™ One-Step RT-PCR Kit with SYBR® Green	Bio-Rad, München, Deutschland	RT-qPCR
Nucleospin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	DNA-Reinigung und Elution aus Agarosegelen
Nucleospin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	Plasmidpräparation
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	Präparation von Gesamt-RNA

3.2 Stämme

Tab. 3.5: Verwendete Stämme

Stamm	**Relevante Genotypische Marker**	**Referenz**
B. subtilis 168 *trp+*		Zeigler *et al.*, 2008
B. subtilis WH1097	Derivat von 168 *trp+*, *xylR::erm* (pIW11xylR-)	Diese Arbeit
B. subtilis WH1117	Derivat von 168 *trp+*, *xylR::erm* (pWH2342)	Diese Arbeit
B. subtilis WH1118	Derivat von 168 *trp+*, *xylR::cat* (pWH2343)	Diese Arbeit
B. subtilis WH1122	Derivat von WH1117, *amyE::*(*xylA::lacZ*, Cm^R)	Diese Arbeit
B. subtilis WH335	*amyE*::($Pxyl_{396bp}$EcoRI/HindIII-*spoVG*-*lacZ*, Cm^R), *trpC*2	Kraus *et al.*, 1994
B. subtilis WH340	Derivat von WH335, *xylR::erm*	Kraus *et al.*, 1994
B. subtilis WH1083	Derivat von 168 *trp+*, *amyE::*(*xynP::lacZ,* Cm^R*)*, *xylR::erm*	Fischer, 2008
B. subtilis WH1084	Derivat von 168 *trp+*, *amyE::*(*xynP::lacZ,* Cm^R*)*	Fischer, 2008
B. subtilis WH600	*trpC*2, *amyE::*(*alsS::lacZ, aphA*3)	Sprehe, unpubliziert
B. subtilis WH649	*trpC*2, Δ*ccpA*, *aphA*3	Sprehe, 2007
B. subtilis WH1078	Derivat von WH649, *amyE::(alsS::lacZ,* Cm^R*)*	Diese Arbeit

B. subtilis GP335	*trpC2 lys-3 ccpA*::Tn*917 erm*, *ptsH*I	Ludwig *et al.*, 2002
B. subtilis WH1079	Derivat von GP335, *amyE::(alsS::lacZ* Cm^{R}*)*	Diese Arbeit
B. subtilis QB5223	*trpC*2, *ptsH*1	Martin-Verstraete *et al.*, 1995
B. subtilis 1126	Derivat von QB5223, *amyE::(alsS::lacZ,* Cm^{R})	Diese Arbeit
E. coli DH5α	*recA*1; *endA*1; *gyrA*96; *thi*; *relA*1; *hsd*R17(rK-, mK+); *supE*44; Φ80d*lacZ*ΔM15; Δ(*lacZYA-argF*)U169	Hanahan, 1983

3.3 Plasmide

Tab. 3.6: Verwendete Plasmide

Plasmid	**Genotypische Charakterisierung**	**Referenz**
pAC6	Integrationsplasmid in *B. subtilis amyE*, *bla*, *cat*, promotorfreies *lacZ*	Stülke *et al.*, 1997
pBSKII(-)	*E. coli*-Phagemid, *bla*, *rep* (pMB1)	Fermentas
pHT304	Amp^R, Erm^R, *ori*colE1, *ori*1030	Arantes & Lereclus, 1991
pIW11xylR-	pBR322 + 5,8 kb YRp7 EcoRI-Fragment + 5,8 kb BamHI-Fragment *xylR-xylAB* aus *B. subtilis* W23, *xylR::erm*	Kraus *et al.*, 1994
pWH484	Integrationsplasmid in *B. subtilis amyE, bla*, *cat*, $Pxyl_{396bp}$*Eco*RI/*Hind*III-*spoVG-lacZ*	Kraus, 1993
pWH336	pAC6-Derivat, *amyE::*(*alsS::lacZ*)	Sprehe, 2007
pWH2341	pBSKII(-)-Derivat, *xylR* integriert	Diese Arbeit
pWH2342	pWH2341-Derivat, *xylR::erm*	Diese Arbeit
pWH2343	pWH2341-Derivat, *xylR::cat*	Diese Arbeit
pWH2348	pHT304-Derivat, 3‘-Ende *xynP*	Diese Arbeit
pWH2349	pHT304-Derivat, 3‘-Ende *xylA*	Diese Arbeit

3.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden (Tab. 3.7), wurden von MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

Tab. 3.7: Verwendete Oligonukleotide. Die Schnittstellen sind einfach unterstrichen und der T7-Promotor doppelt unterstrichen gekennzeichnet.

Bezeichnung	**Verwendung**	**Nukleotidsequenz (5‘ → 3‘)**
cDNA_xylA2	RT *xylA*	GTGTGGAAATTAGCTCTTCC
cDNA_xylA3	RT *xylA*	TTCAGTAAAGCTGCGGTAAC
cDNA_xylA4	RT *xylA*	TTCAAGACCAATCCCTTCAG
cDNA_xylA5	RT *xylA*	TAACGATGTTGAATCACATC
cDNA_xylArev	RT *xylA*	TCTTCGATTAATTTGTGGGC
cDNA_xynP1	RT *xynP*	ATATTTTTTCTCATCTAAGT
cDNA_xynP2	RT *xynP*	TCTCTAATTCTCGAACCATG
cDNA_xynP3	RT *xynP*	TAAACTTTGTCTCTATTCTC
cDNA_xynP4	RT *xynP*	CAATATGATCCAAATAAACT
MS_amyE_back	Kolonie-PCR pAC‘xylR	TGGTTTCTTTCGGTAAGTC
NSt_CmRfwSnaBI	Klonierung pWH2343	CTTGATGCCTACGTATTATGTACTGTGGATCCCCG
NSt_CmRrevSnaBI	Klonierung pWH2343	CGGAGTCGGTACGTATATCTCATATTATAAAAGCC
NSt_ermfwSnaBI	Klonierung pWH2342	CGCCATGAATACGTATCGATTCACAAAAAATAGGC
NSt_ermrevSnaBI	Klonierung pWH2342	GCGTATGCTAATACGTAGCATCTGACCGAATTTTACG
NSt_pAC6fwBam	Klonierung *xylR* in pAC6	ATTGGATCCAGACGGGACTTACCGAAAGA
NSt_pAC6rvBlp	Klonierung *xylR* in pAC6	AGCGCTGAGCAAATATGTATCCGCTCATGA
NST_xylAfwdEco	Klonierung pWH2349	ATGGAATTCTGCCACATTAGCCGGGCATA

NSt_xylAivT	PCR Dot Blot Standard *xylA*	ATAGGTGATGTACTTACTAT
NST_xylArevBam	Klonierung pWH2349	CCAGGATCCGTGTGGAAATTAGCTCTTCC
NSt_xylArevT7	PCR Dot Blot-Standard *xylA*	CCAAGCCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGATCTGGAGCTTATCCTG
NSt_xylRfwBam	Klonierung *xylR* in pAC6	CTTGGATCCTATCTGAAATGACTGGATTA
NSt_xylRrvBlp	Klonierung *xylR* in pAC6	ACCGCTGAGCATTACATTGTAATCATGTCC
NST_xynPfwdEco	Klonierung pWH2348	ATGGAATTCACCGTTTATTCCAAGGCTTC
NSt_xynPivT	PCR Dot Blot-Standard *xynP*	CACACTGTTTCATATTAAAG
NST_xynPrevBam	Klonierung pWH2348	AACGGATCCGCTCCTCCTCAGTTTATTTT
NSt_xynPrevT7	PCR Dot Blot-Standard *xynP*	CCAAGCCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGGCTCCTCCTCAGTTTATTT
pHT304Seq_mcs	Sequenzierung pWH2348/49	AGGCGATTAAGTTGGGTAAC
pHT304Seq2fw	Kolonie-PCR pAC'xylR	AATGCTTAATCAGTGAGGCA
rtPCR_xylAfwd6	qPCR *xylA*	TCCTCTTTTAGGCTGGGACA
rtPCR_xylArev6	qPCR *xylA*	GATCTTCTGACCTTCGCGTC
rtPCR_xynPfwd1	qPCR *xynP*	TGTTCCCTTACTGGCTGCTT
rtPCR_xynPfwd2	qPCR *xynP*	GCTTTACTGTTTGTTCCGCC
rtPCR_xynPfwd3	qPCR *xynP*	GGACTGGGAAAAGAATGGGT
rtPCR_xynPrev1	qPCR *xynP*	GAGCGGGTCACTCTTCAAAA
rtPCR_xynPrev2	qPCR *xynP*	ACCCATTCTTTTCCCAGTCC
rtPCR_xynPrev3	qPCR *xynP*	AGAACAAGCAAGAACACGGG
Sonde_xylA6_T7	RNA-Sonde *xylA*	CCAAGCCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGATCTTCTGACCTTCGCGTC
Sonde_xynP2_T7	RNA-Sonde *xynP*	CCAAGCCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAACCCATTCTTTTCCCAGTCC

3.5 Medien

3.5.1 Vollmedien

Alle Vollmedien wurden hergestellt, indem alle Komponenten in deionisiertem Wasser gelöst und anschließend bei 121°C für 20 min autoklaviert wurden. Für die Herstellung von Festmedien wurde zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar vor dem Autoklavieren zugegeben.

LB

10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l Natriumchlorid

Stärketestmedium

7,5 g/l Nutrient Broth
5 g/l Stärke

3.5.2 Minimalmedien

Minimalmedium wurde hergestellt, indem die entsprechende Menge autoklaviertes deionisiertes Wasser in ein sterilisiertes Gefäß vorgelegt wurde. Anschließend wurden die weiteren Komponenten als sterilisierte Stocklösung in der angeführten Reihenfolge zugefügt.

<u>CSK + BCAA</u>

1 x	C-Salze
0,6 % (w/v)	Na-Succinat
0,8 % (w/v)	Kaliumglutamat
50 µg/ml	L-Tryptophan
1 x	CAF
1 x	III'-Salze
1 x	Verzweigtkettige Aminosäuren
1 % (w/v)	C-Quelle (fakultativ)

<u>MNGE</u>

1 x	MN
1 % (w/v)	Glukose
0,2 % (w/v)	Kaliumglutamat
50 µg/ml	L-Tryptophan
0,5 x	CAF
3 mM	$MgSO_4$

<u>$M9_{SysMO}$</u>

100 µM	$CaCl_2$
1 x	Spurensalze
1 mM	$MgSO_4$
50 µM	$FeCl_3$
100 µM	Natriumcitrat
0,1 % (w/v)	Na-Succinat
0,1 % (w/v)	Glukose
1 x	M9 Stock

Das Minimalmedium des SysMO-Projektes wurde mit autoklaviertem HPLC-gereinigtem Wasser von Baker angesetzt.

3.5.3 Stammlösungen für Minimalmedien

Alle Stammlösungen für die Minimalmedien CSK und MNGE wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Die Stammlösungen für $M9_{SysMO}$ (mit * gekennzeichnet) wurden gesondert mit HPLC-gereinigtem Wasser von Baker angesetzt. Die mit (A) gekennzeichneten Lösungen wurden 20 min bei 121°C autoklaviert, die mit (S) markierten Lösungen wurden mittels eines

Sterilfilters mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilisiert. Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Lösungen bei Raumtemperatur gelagert.

C-Salze, 5 x (A)

125 mM $(NH_4)_2SO_4$

350 mM K_2HPO_4

130 mM KH_2PO_4

Kaliumglutamat, 40 % (S)

40 g L-Glutaminsäure/100 ml H_2O

Die L-Glutaminsäure wurde eingewogen und mit 2/3 des Endvolumens H_2O aufgeschlämmt. Anschließend wurden KOH-Plätzchen zugegeben, bis die Lösung aufklart. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

Verzweigtkettige Aminosäuren (BCAA), 100 x (S)

0,4 % (w/v) Valin

0,5 % (w/v) Leucin

0,25 % (w/v) Isoleucin

0,2 % (w/v) Methionin

$CaCl_2$, 100 mM (A)*

14,7 g/l $CaCl_2$*$2H_2O$

$MgSO_4$, 1 M (A)*

246 g/l $MgSO_4$*$7H_2O$

Na-Succinat, 30 % (A)

30 % (w/v) Na-Succinat

L-Tryptophan, 5 mg/ml (S)

5 mg/ml L-Tryptophan,

Die Lösung wurde durch Zugabe von einem Tropfen HCl aufgeklart und bei 4°C gelagert.

III‘-Salze, 100 x (A)

50 mM $MgSO_4$

1 mM $MnSO_4$

CAF, 100 x (A)

2,2 mg/ml Ammoniumeisen(III)citrat

MN, 10 x (A)

440 mM KH_2PO_4

600 mM K_2HPO_4

30 mM tri-Natriumcitrat

150 mM $(NH_4)_2SO_4$

M9 Stock, 5 x (A)*

42.5 g/l Na_2HPO_4*$2H_2O$

15 g/l KH_2PO_4

5.0 g/l NH_4Cl

2.5 g/l NaCl

Die M9-Stocklösung wurde auf pH 7,0 eingestellt.

Spurensalze, 100 x (S)*

60 mg/l Na_2MoO_4*$2H_2O$

43 mg/l $CuCl_2$*$2H_2O$

60 mg/l $CoCl_2$*$6H_2O$

100 mg/l $MnCl_2$*$4H_2O$

170 mg/l $ZnCl_2$

Die Spurensalz-Lösung wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

$FeCl_3$-Lösung, 50 mM mit 100 mM Zitronensäure (S)*

13,5 g/l $FeCl_3$*$6H_2O$

29,4 g/l $Na_3C_6H_5O_7$*$2H_2O$

Die Eisenchlorid-Lösung wurde bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Stammlösung C-Quelle (A)

20 % (w/v) Glukose
Fruktose
Mannose
Glycerol
Sorbit
Gluconat
Arabinose

10 % (w/v) Mannitol

Na-Succinat, 25 % (A)*

25 % (w/v) Na-Succinat

Glukose, 50 % (A)*

50 % (w/v) Glukose

Antibiotikazusätze

Die Antibiotika-Stocklösungen wurden 1000-fach konzentriert hergestellt und jeweils in einfacher Endkonzentration im Medium eingesetzt. Die Substanz wurde im entsprechenden Solvens gelöst und nach dem Sterilfiltrieren bei -20°C gelagert.

Tab. 3.8: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Verwendung	Konzentration Stammlösung
Ampicillin	Selektion *E. coli*	100 mg/ml in H_2O
Chloramphenicol	Selektion *B. subtilis*	5 mg/ml in 70 % Ethanol
Kanamycin	Selektion *B. subtilis*	15 mg/ml in H_2O
Erythromycin	Selektion *B. subtilis*	10 mg/ml in 70 % Ethanol
Rifampicin	Bestimmung der Transkript-Halbwertszeit	100 mg/ml in DMSO

3.6 Puffer und Lösungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit deionisiertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls für 20 min bei 121°C autoklaviert (A) bzw. mittels Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) sterilisiert (S).

3.6.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

Tris-HCl, 1 M, pH 8,0

1 M Tris

Der Puffer wurde mit Salzsäure auf pH 8,0 eingestellt.

TE

10 mM	Tris-HCl pH 8,0
1 mM	EDTA

3.6.2 Lösungen für Agarosegelelektrophorese

TAE, 50 x

242 g/l	Tris-Base
100 ml/l	0,5 M EDTA, pH 8,0
57,1 ml	Essigsäure

Der Puffer wurde mit Essigsäure auf pH 8,3 eingestellt.

RNA-Ladepuffer, 2 x

95 % (v/v)	Formamid
0,025 % (w/v)	SDS
0,025 % (w/v)	Bromphenolblau
0,025 % (w/v)	Xylencyanol
0,025 % (w/v)	Ethidiumbromid
0,5 mM	EDTA

DNA-Auftragepuffer, 4 x

0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
0,1 % (w/v)	Xylencyanol
50 % (v/v)	Glyzerin
2 % (v/v)	50 x TAE

Färbelösung für DNA-/RNA-Gele

0,5 mg/l	Ethidiumbromid

Größenmarker für DNA-Fragmente

DNA-Leiter-Mix, PEQLAB, Erlangen, Angaben in bp

10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

Ultra Low Range DNA-Leiter I, PEQLAB, Erlangen, Angaben in bp

300, 200, 150, 100, 75, 50, 35, 25, 20, 15, 10

Größenmarker für RNA-Fragmente

High Range RNA-Leiter, PEQLAB, Erlangen, Angaben in bp

6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500, 200

3.7 Methoden

3.7.1 Allgemeine Methoden

Tab. 3.9: Allgemeine Methoden

Methode	**Referenz**
Dephosphorylierung von 5´-Hydroxygruppen mittels SAP	Protokoll des Herstellers
Elution von DNA aus Agarosegelen	Protokoll des Herstellers
Ethidiumbromid-Färbung von DNA	Sambrook & Russell, 2001
Gelelektrophorese von DNA	Sambrook & Russell, 2001
Herstellung $CaCl_2$-kompetenter *E. coli* Zellen	Sambrook & Russell, 2001
Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4 DNA Ligase	Sambrook & Russell, 2001
Ligation von DNA-Fragmenten mittels Quick DNA Ligase	Protokoll des Herstellers

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	Sambrook & Russell, 2001
Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels Nucleospin® Plasmid	Protokoll des Herstellers
Restriktion von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	Protokoll des Herstellers
Sequenzierung von DNA (durchgeführt von GATC)	Sanger *et al.*, 1977
Transformation von *E. coli*	Sambrook & Russell, 2001
Quantifizierung von Nukleinsäure mittels NanoDrop	Protokoll des Herstellers

3.7.2 Herstellung natürlich kompetenter *B. subtilis* Zellen

Für die Herstellung natürlich kompetenter *Bacillus subtilis*-Zellen wurden 10 ml MNGE mit 0,1 % (w/v) CAA angereichert und mit 1 ml einer bei 28°C gezogenen LB-Übernachtkultur angeimpft. Das Wachstum erfolgte bei 37°C und Schütteln bei 200 rpm. Bei Erreichen einer OD_{600} von 1,3 bis 1,8 wurden der Kultur 11 ml MNGE zugefügt und weitere 60 min geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen entweder direkt für die Transformation eingesetzt oder die Zellen wurden pelletiert, auf eine Endkonzentration von 12,5 % (v/v) Glyzerin eingestellt und in 300 µl-Aliquots mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.7.3 Transformation von *B. subtilis*

Bei der Verwendung gefrorener kompetenter Zellen wurde ein Aliquot für 2 min bei 37°C aufgetaut und mit 1,7 ml 1 x MM, 43 µl 20 % Glukose und

34 µl 1 M $MgSO_4$ versetzt. Anschließend wurde diese Suspension analog zu frischen Zellen weiterverwendet.

Für die Transformation von *B. subtilis* wurden 400 µl Zellsuspension mit 1 µg DNA gemischt und 30 min bei 37°C geschüttelt. Nach Zugabe von 100 µl Expressionsmix erfolgte die Durchmischung auf dem Schüttler für weitere 60 min. Anschließend wurden je nach zu erwartender Transformationseffizienz Volumina von 10 µl bis 100 µl sowie die restliche Zellsuspension auf LB-Platten mit entsprechender Antibiotikakonzentration ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Expressionsmix T

500 µl	Hefeextrakt 5 % (w/v)
250 µl	CAA 10 % (w/v)
50 µl	L-Tryptophan 5 mg/ml
300 µl	H_2O

3.7.4 Stärketest auf Insertion in den *amyE*-Lokus

Die Insertion der gewünschten Sequenz in den *amyE*-Lokus von *B. subtilis* wurde mittels Stärketest überprüft. Dazu wurden die Kandidaten auf Stärketestplatten (Punkt 3.5.1) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurde die Platte mit Lugolscher Lösung überschichtet. Die fehlende Hofbildung bestätigte die Disruption des *amyE*-Gens und damit die Insertion des Genabschnitts.

3.7.5 Anlegen von *Bacillus*-Dauerkulturen

Für die Erstellung einer Dauerkultur wurden 4 ml LB-Medium mit entsprechender Antibiotikazugabe in einem Reagenzglas mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am Folgetag wurde die Zellsuspension auf 20 % (v/v) Glyzerin eingestellt und im Reaktionsgefäß mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Dauerkultur erfolgte bei -80°C.

3.7.6 Flüssigkultur von *B. subtilis*

3.7.6.1 Kultivierung

Die Kultivierung von *B. subtilis* im Rahmen dieses Projektes erfolgte nach einer SOP, welche nachfolgend erläutert wird. Hierbei wurde in allen Flüssigkulturen auf die Verwendung von Antibiotika verzichtet, um ein optimales Wachstum der Bakterien zu ermöglichen. Das Medienvolumen wurde stets so gewählt, dass 8 % des nominellen Volumens des Kultivierungsgefäßes nicht überschritten wurde.

Es erfolgte eine Vorkultivierung in LB (VK_1), bei der 8 ml LB in einem 100 ml-Schikanekolben mit einer Einzelkolonie beimpft und bei 37°C und 300 rpm geschüttelt wurde, bis eine OD_{600} von 0,5 ± 0,05 erreicht war. Anschließend erfolgte die zweite Vorkultivierung in $M9_{SysMO}$ (VK_2) in 300 ml-Erlenmeyerkolben. Hierfür wurde die LB-Vorkultur mit $M9_{SysMO}$ 1:5000, 1:7500 und 1:10.000 verdünnt und 12 bis 14 h bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Die Inokulation der Hauptkultur auf eine OD_{600} von 0,04 ± 0,01 erfolgte mit derjenigen Verdünnungsstufe der VK_2, welche eine OD_{600} von 0,4 bis 0,6 aufwies. Die Kultivierung erfolgte vergleichbar zu den Vorkulturen bei 37°C und 300 rpm.

3.7.6.2 Lebendtiterbestimmung

Für jede Probe erfolgte die Bestimmung des Lebendtiters, indem zwei aufeinander folgende Verdünnungsstufen je nach erwarteter Zellzahl gewählt und jeweils im Doppelansatz quantifiziert wurden. Dazu wurden mit $M9_{SysMO}$ Verdünnungen von 1:50.000 bis 1:1.000.000 erstellt und je 100 µl der Suspension auf LB-Agar ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet und am Folgetag ausgewertet.

3.7.6.3 Probennahme für Quantifizierung der intrazellulären Transkriptmenge

Die Probennahme erfolgte in einem 30 min-Takt. Hierfür wurden bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,2 je 25 ml Kultur und ab einer OD_{600} von 0,2 je 5 OD_{600}-Äquivalente entnommen und mit einem Volumen eiskalter GTC-Lösung vermischt. Anschließend wurden die Zellen bei 18.000 x g und 4°C zentrifugiert und das Pellet bis zur Präparation der Gesamt-RNA bei -20°C gelagert.

GTC-Lösung

4 M	Guanidinthiocyanat
0,74 % (w/v)	tri-Natriumcitrat
0,5 % (w/v)	Natrium-N-Lauroylsarcosinat

Die Lösung wurde mit Zitronensäure auf pH 6,8 bis 7,0 eingestellt und bei 4°C gelagert.

3.7.7 Allgemeine RNA-Arbeiten

Alle Lösungen und Puffer für die Arbeit mit RNA wurden mit H_2O_{RNA} angesetzt, welches durch Behandlung mit Diethylcarbonat als RNase-frei

angesehen werden kann. Reine Chemikalien wie z.B. Ethanol wurden aus separaten Originalabfüllungen entnommen. Die verwendeten Glaswaren wurden soweit möglich für 4 h bei 200°C gebacken. Alle weiteren Arbeitsgeräte und Plastikwaren sowie die Oberflächen wurden mit RNase AWAY® behandelt. Die Arbeiten mit RNA wurden durchgehend mit Handschuhen und auf Eis durchgeführt und es wurden beschichtete Pipettenspitzen verwendet.

H_2O_{RNA}

0,1 % (v/v) Diethylcarbonat-Lösung in deionisiertem Wasser

Die Lösung wurde über Nacht auf dem Magnetrührer gemischt und anschließend für 20 min bei 121°C autoklaviert.

3.7.8 Präparation der Gesamt-RNA aus *B. subtilis*

Die Präparation der Gesamt-RNA von *Bacillus subtilis* erfolgte mittels des RNeasy® Mini Kits nach adaptierter Anleitung des Herstellers. Die Zelllyse erfolgte mittels des Precellys Homogenisators, dabei wurde die Zellsuspension in entsprechenden Reaktionsgefäßen mit Schwefelsäure-behandelten Glasperlen (0,1 mm Durchmesser) zweimal je 30 Sekunden bei 5600 rpm geschüttelt. Anschließend wurde weiter nach Anleitung des Herstellers verfahren. An entsprechender Stelle wurde auf der Säule eine zusätzliche Restriktion der genomischen DNA mittels DNase für 1 h bei Raumtemperatur nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Bestimmung der Konzentration und der Qualität der RNA erfolgte per Dreifachbestimmung mittels des NanoDrop Spektrometers. Für alle nachfolgenden Analysen wurde nur Gesamt-RNA mit einem 260/280 nm-Verhältnis >1,8 verwendet.

3.7.9 Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

3.7.9.1 Allgemeine Vorgehensweise

Alle RT-qPCR-Analysen wurden mit dem „iScript™ One-Step RT-PCR Kit with SYBR® Green“ in 25 µl-Ansätzen durchgeführt, wobei stets 10 µl Templat und 15 µl Mastermix pipettiert wurden. Es wurden beschichtete Filter-Pipettenspitzen benutzt. Für das Pipettieren der Lösungen in die 96-Well-Platte wurde das Pipettensystem von Eppendorf verwendet. In Tabelle 3.10 ist das verwendete RT-qPCR-Programm aufgeführt.

Tab. 3.10: Programm der RT-qPCR

Temperatur	**Zeitdauer**	**Wiederholungen**	**Anmerkungen**
50°C	10 min	-	Reverse Transkription
95°C	5 min	-	Hitzeaktivierung der DNA-Polymerase
95°C	10 s	45 x	
Annealing-temperatur	30 s		
72°C	10 s		Aufnahme des Fluoreszenzsignals
95°C	1 min	-	
55°C	1 min	-	
55°C – 95°C	10 s je 0,5°C Steigerung	81 x	Schmelzkurvenanalyse

Die Auswertung der Analyse erfolgte mittels der Gerätesoftware nach den Angaben des Herstellers sowie nach Bustin *et al.* (2009). Im Folgenden werden die verwendeten qPCR-Ansätze erläutert.

3.7.9.2 Analyse des externen Standards

Dieser Ansatz ermöglichte die Quantifizierung von DNA in einer qPCR und setzte sich wie folgt zusammen:

1 x	SYBR Green RT-PCR Reaktionsmix
0,24 µM	Vorwärts-Oligonukleotid qPCR
0,24 µM	Rückwärts-Oligonukleotid qPCR
	Templat (abhängig von Anwendung)

Für die Erstellung einer externen Standardkurve zur Quantifizierung der intrazellulären Transkriptmenge wurden auf jeder RT-qPCR-Platte zwei bis drei Verdünnungsreihen von 10^9 bis 10^3 Kopien pro Ansatz des entsprechenden Standardplasmids als Templat mitgeführt und mittels des oben beschriebenen Mastermixes detektiert. Die resultierenden C_q-Werte wurden gegen die eingesetzte Kopienzahl des Plasmids aufgetragen und so die Standardkurve erhalten. Aus der Steigung *a* der Standardkurve berechnete sich die PCR-Effizienz nach Gleichung (3.1):

$$\mathrm{PCR-Effizienz\ E\ [\%]} = \left(\left(10^{-\frac{1}{a}}\right) - 1\right) * 100\ \% \qquad (\mathbf{3.1})$$

3.7.9.3 Kontrolle auf DNA-Spuren in der Gesamt-RNA

Für die Kontrolle auf Spuren genomischer DNA wurde pro Gesamt-RNA-Präparation und zu untersuchendem Transkript eine Analyse durchgeführt. Dazu wurde je 100 ng Gesamt-RNA pro Ansatz als Templat eingesetzt, die Zusammensetzung der Reaktion ist unter Punkt 3.7.9.2 beschrieben. Durch

Verwendung von Gleichung (3.2) wurde der prozentuale Anteil der genomischen DNA im Vergleich zur Gesamt-RNA ermittelt:

$$\text{Rest} - \text{DNA}\ [\%] = \frac{100}{10^{\left(\frac{\text{Cq DNA} - \text{Cq RNA}}{\text{E}}\right)}} \qquad (\mathbf{3.2})$$

C_q DNA: C_q-Wert der Probe in der Analyse ohne Reverse Transkription; C_q RNA: C_q-Wert der Probe von der Analyse mit Reverser Transkription (siehe Punkt 3.7.9.4); E: Effizienz der PCR-Reaktion

3.7.9.4 Quantifizierung der spezifischen mRNA

Die Quantifizierung der spezifischen mRNA erfolgte mittels dieses RT-qPCR-Ansatzes:

1 x	SYBR Green RT-PCR Reaktionsmix
0,24 µM	Vorwärts-Oligonukleotid qPCR
0,24 µM	Rückwärts-Oligonukleotid qPCR
0,24 µM	genspezifisches RT-Oligonukleotid
1 x	Reverse Transkriptase
100 ng	Gesamt-RNA

Jede Probe wurde im Dreifachansatz vermessen, dessen Mittelwert wurde für die Berechnung der intrazellulären Transkriptmenge verwendet. Hierfür wurde aus dem gemittelten C_q-Wert der Probe mithilfe der Geradengleichung der Standardkurve die mRNA-Menge in 100 ng Gesamt-RNA berechnet.

Unter Verwendung von Gleichung (3.3) wurde die Transkriptmenge je KbE ermittelt:

$$\text{Transkript pro KbE} = \frac{\text{N(100 ng)} * \text{V(RNA)} * \text{c(RNA)}}{\text{100 ng} * \text{V(Probe)} * \text{N(KbE)}} \qquad (\mathbf{3.3})$$

N(100ng): Anzahl Transkripte in 100 ng Gesamt-RNA; V(RNA): Gesamtvolumen des RNA-Eluats der Präparation; c(RNA): Gesamt-RNA-Konzentration; V(Probe): Kulturvolumen entsprechend 5 OD_{600}-Äquivalenten; N(KbE): Lebendtiterzahl zum Zeitpunkt der Probennahme

3.7.10 Bestimmung der mRNA-Halbwertszeit

Die Bestimmung der Halbwertszeit des Transkripts erfolgte durch Zugabe von 100 µg/ml Rifampicin zu einer Bakterienkultur (siehe Punkt 3.7.6.1). Anschließend wurde 15 bis 18 min lang jede Minute 1 ml Kultur mit 1 ml GTC-Lösung vermischt, die Zellen pelletiert, mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Präparation der Gesamt-RNA (Punkt 3.7.8) sowie die Quantifizierung der Transkriptmenge (Punkt 3.7.9) erfolgte wie bereits beschrieben.

Die Auftragung der Transkripte je KbE als Funktion der Zeit nach Zugabe von Rifampicin resultiert in der Abbaukurve, aus deren exponentiellem Abfall die Abbaurate und damit die Halbwertszeit ermittelt wurden.

3.7.11 RNA-Hybridisierung (Dot Blot)

Die Analyse der Genexpression auf mRNA-Level erfolgte durch quantitative RNA-Hybridisierungsexperimente. Nachfolgend wird die Herstellung des *in vitro*-Transkripts als Basis für die Standardkurve sowie der hochspezifischen RNA-Sonden erläutert.

3.7.11.1 Herstellung eines externen RNA-Standards

Die Herstellung einer RNA-basierten externen Standardkurve ermöglichte die quantitative Auswertung der RNA-Hybridisierungsexperimente. Dazu wurde eine DNA-Matrize mit einem T7-Promotor am 3'-Ende per *in vitro*-Transkription nach folgendem Ansatz in RNA umgeschrieben:

3 – 4,5 µg	DNA-Matrize
25,5 mM	Magnesiumacetat
200 mM	Tris-HCl pH 8,0
20 mM	DTT
2 mM	Spermidin
4 mM	ATP
4 mM	CTP
4 mM	GTP
4 mM	UTP
200 U	Protector RNase-Inhibitor
150 U	T7 RNA-Polymerase

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 28°C inkubiert. Am Folgetag wurde er in 500 µl-Aliquots aufgeteilt und je Ansatz wurden 50 µl 3 M

Natriumacetat zugefügt. Anschließend erfolgte die Fällung der RNA durch Zugabe von 1,5 ml eines eiskalten 1:1 Ethanol-Aceton-Gemischs und Inkubation für 1 h bei -20°C. Danach wurde die RNA durch 30-minütiges Zentrifugieren pelletiert und das Pellet zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet an der Luft getrocknet war, wurde es in 87,5 µl H_2O_{RNA} aufgenommen und die Matrizen-DNA wurde durch eine Behandlung mit DNase nach Herstellerangaben abgebaut. Abschließend wurde die RNA mittels des RNeasy® Mini Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt und bei -80°C gelagert.

3.7.11.2 Herstellung der genspezifischen RNA-Sonden

Die Herstellung der hochspezifischen RNA-Sonden für die Detektion der gewünschten mRNA in RNA-Hybridisierungsexperimenten erfolgte durch *in vitro*-Transkription des genspezifischen qPCR-Produktes. Dabei wurde im ersten Schritt dieser DNA-Matrize während der Amplifizierung mittels PCR am 3‘-Ende ein T7-Promotor angefügt. Anschließend erfolgte die *in vitro*-Transkription mit simultaner Digoxygenin-Markierung nach folgendem Reaktionsansatz:

250 ng	PCR-Produkt
1 x	RNA-Polymerase Puffer
1 x	DIG RNA Labeling Mix
100 U	T7 RNA-Polymerase

Der Reaktionsansatz wurde 3h bei 37°C inkubiert und anschließend mittels der illustra MicroSpin™ G-50 Säulchen aufgereinigt. Die RNA-Sonden wurden bei -20°C gelagert.

3.7.11.3 Durchführung des Dot Blots

Für die Analyse der Genexpression mittels RNA-Hybridisierungs-experimenten wurde jede Probe auf eine Konzentration von 3 µg Gesamt-RNA pro 100 µl Blottingwasser eingestellt. Die positiv geladene Nylonmembran wurde in 10 x SSC äquilibriert. Anschließend wurde die RNA mittels eines Vakuumblotters auf die Membran transferiert. Dazu wurde jede benötigte Öffnung mit 100 µl Blottingwasser vorgespült, die RNA-Lösung aufgetragen und abschließend jede Öffnung mit 100 µl Blottingwasser nachgespült. Nachdem die Membran 5 min bei 65°C getrocknet wurde, erfolgte das Fixieren der RNA im UV-Stratalinker 1800 zweimal mittels Autocrosslink-Modus bei 120 mJ. Anschließend wurde die Membran mit Hybridisierungslösung 2 h bei 68°C blockiert. Die Hybridisierung erfolgte durch Zugabe von 5 µl Sondenlösung und Rotieren bei 68°C über Nacht im Hybridisierungsofen. Am Folgetag wurde die Membran zweimal je 15 min mit Waschpuffer I bei Raumtemperatur gespült. Anschließend erfolgte das hochstringente Waschen mit Waschpuffer II zweimal für je 25 min bei 68°C. Die Membran wurde mit 1 x Blockierlösung für 2 h bei Raumtemperatur sanft geschüttelt, dann erfolgte die Behandlung mit Antikörperlösung für 1 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x Maleinsäurepuffer für je 20 min bei Raumtemperatur wurde die Membran 5 min mit Detektionspuffer äquilibriert. Die Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität erfolgte mittels Zugabe des Chemilumineszenz-Subtrates CSPD nach Herstellerangaben und anschließender Detektion im ChemiDoc XRS.

<u>Blockierlösung, 10 x (A)</u>

10 g Blocking Reagenz wurden in 100 ml 1 x Maleinsäurepuffer suspendiert, zum Lösen in der Mikrowelle erhitzt, ohne es zum Sieden zu bringen, und anschließend 40 min bei 121°C autoklaviert.

<u>SSC, 20 x (A)</u>

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat
Der Puffer wurde mit 1 M Zitronensäure auf pH 7 eingestellt

<u>Blockierlösung, 1 x</u>

1 Teil	10 x Blockierlösung
9 Teile	1 x Maleinsäurepuffer

Aliquots à 10 ml wurden bei -20°C gelagert.

<u>Waschpuffer I</u>

2 x	SSC
0,1 % (w/v)	SDS

<u>Waschpuffer II</u>

0,2 x	SSC
0,1 % (w/v)	SDS

<u>Detektionspuffer (A)</u>

0,1 M	Tris-Base
0,1 M	NaCl

Der Puffer wurde mit 1 M NaOH auf pH 9,5 eingestellt.

<u>Hybridisierungslösung</u>

2 x	Blockierlösung
0,1 % (w/v)	N-Lauroylsarkosinat
0,02 % (w/v)	SDS
50 % (v/v)	Formamid
5 x	SSC

<u>Blottingwasser</u>

10 x	SSC
100 µl/l	2 x RNA-Ladepuffer

<u>Maleinsäurepuffer, 10 x (A)</u>

1 M	Maleinsäure
1,5 M	NaCl
72 g/l	NaOH-Plätzchen

Der Puffer wurde mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt.

<u>Antikörperlösung, 20 ml</u>

1 x	Blockierlösung
6 µl	DIG-AP-Konjugat

3.7.12 Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität

3.7.12.1 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung von *B. subtilis* zur Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte abhängig vom verwendeten Stamm. Die Untersuchung der Expression von *xylA* und *xynP* erfolgte durch Anzucht in $M9_{SysMO}$ wie unter Punkt 3.7.6.1 beschrieben. Die Analyse der *alsS*-Expression erfolgte in CSK+BCAA, wobei ebenfalls mit Vorkulturen gearbeitet wurde. Die Kulturen

wurden bei 37°C und 200 bis 300 rpm geschüttelt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde die OD_{600} der Kultur bestimmt und 1 ml Probe gezogen. Erfolgte der β-Galaktosidase-Aktivitätstest direkt im Anschluss, so wurde die Probe für 30 min auf Eis gestellt und dann wie unter Punkt 3.7.12.2 beschrieben weiter verfahren. Sollte der Enzymtest zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden, so wurde die Probe unmittelbar mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

3.7.12.2 β-Galaktosidase-Aktivitätstest

Die Zellsuspension (frisch oder aufgetaut) wurde mit 900 µl 1 x Z-Puffer verdünnt und die Zellen durch Inkubation mit je 10 µl Lysozymlösung für 20 min bei 28°C lysiert. Danach wurde je ein Tropfen Triton-X 100 zugefügt und für weitere 10 min bei 28°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl ONPG-Lösung gestartet und bei 28°C bis zur gewünschten Gelbfärbung inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mittels 500 µl Stopplösung beendet und die Absorption bei 420 nm und 550 nm per Spektralphotometer bestimmt. Die spezifische Aktivität der β-Galaktosidase wurde mittels Gleichung (3.4) berechnet:

$$\mathrm{\beta - Galaktosidase - Aktivität\ [Miller\ Einheiten]} = \frac{\mathrm{A420 - 1{,}75 * A550}}{\mathrm{OD600 * V * t}} * 1000 \qquad (\mathbf{3.4})$$

A420: Absorption von *o*-Nitrophenol; A550: Absorption der Zelltrümmer; OD600: Zelldichte der Kultur; V: Probenvolumen in ml; t: Reaktionszeit in min

Z-Puffer, 5 x

300 mM	$Na_2HPO_4*12H_2O$
200 mM	$NaH_2PO_4*H_2O$
50 mM	KCl
5 mM	$MgCl_2*7H_2O$
250 mM	β-Mercaptoethanol

1 x Z-Puffer wurde kurz vor Verwendung frisch mit β-Mercaptoethanol versetzt

Lysozymlösung

10 mg/ml Lysozym in 1 x Z-Puffer

ONPG-Lösung

4 mg/ml *o*-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid in 1 x Z-Puffer

Stopplösung

1 M Na_2CO_3

4 Ergebnisse

4.1 Optimierung des Minimalmediums M9

Das Durchführen von Analysen in unabhängigen Laboren und anschließendes Zusammenführen der gewonnenen Daten zur Erstellung eines dynamischen Computermodells erforderte eine SOP-basierte Arbeitsweise, um gleichbleibende und damit vergleichbare Versuchsbedingungen zu gewährleisten. Unter Einbeziehung von vorangegangenen Arbeiten (Fischer, 2008) und auf Basis der Protokolle des Projektes BaSysBio wurde von den Kooperationspartnern unseres SysMO-Projekts eine SOP für die Durchführung von Batchkulturen von *B. subtilis* in Schüttelkolben erarbeitet. Als Basismedium für alle Versuche im Rahmen von SysMO wurde M9 mit je 0,1 % (w/v) Glukose und Succinat definiert. Die Zugabe von Natriumcitrat ermöglicht *B. subtilis* in Minimalmedium ein deutlich besseres Wachstum (Ollinger *et al.*, 2006) und wurde daher zusätzlich in die SOP eingefügt. In dieser Arbeit wurden vergleichende Wuchskurven mit M9 bzw. mit M9 unter Zugabe von 100 µM Natriumcitrat wie unter Punkt 3.7.6.1 beschrieben durchgeführt (Abb. 4.1). Die Zugabe des Citrats im M9 resultierte in einer deutlich höheren Wuchsrate von $\mu = 0{,}648\ h^{-1}$ im Vergleich zu M9 allein, worin *B. subtilis* eine Wuchsrate von nur $0{,}318\ h^{-1}$ erreichte. Dies führte zu einer Vorverlegung des Übergangs von exponentiellem Wachstum auf Glukose zur stationären Phase um drei Stunden. Im Folgenden wurde daher das Kultivierungsmedium M9 mit jeweils 0,1 % (w/v) Glukose und Succinat sowie 100 µM Natriumcitrat als $M9_{SysMO}$ bezeichnet.

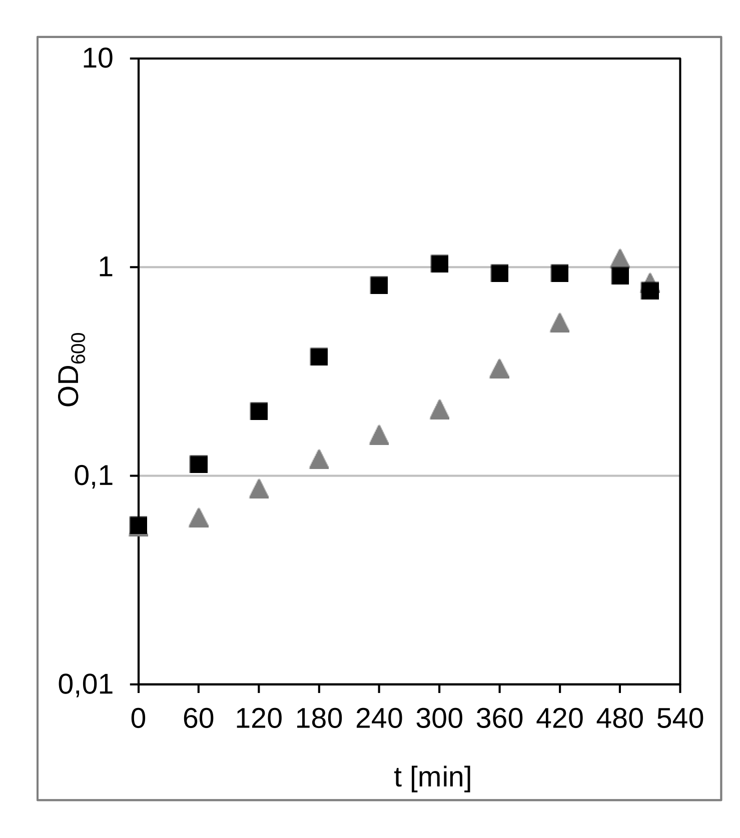
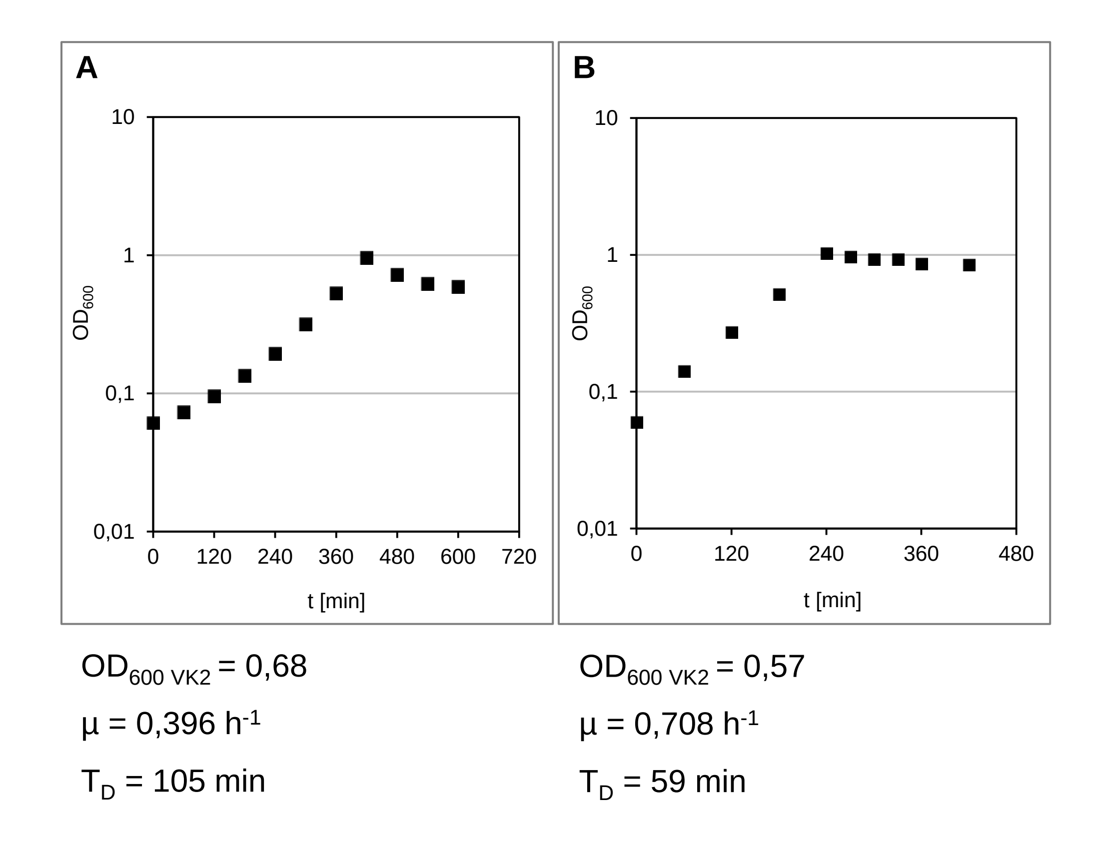


Abb. 4.1: Wuchskurve von *B. subtilis* 168 in $M9_{SysMO}$ ohne (▲) und mit (■) Zugabe von 100 µM Natriumcitrat. Durch Zugabe von Natriumcitrat verdoppelt sich die Wuchsrate auf 0,648 h^{-1}.

4.2 Optimierung der Vorkultur

Ein weiterer entscheidender Faktor, der die Wuchsrate beeinflusste, war die optische Dichte der Übernachtkultur (VK_2, siehe Punkt 3.7.6.1) in $M9_{SysMO}$ zum Zeitpunkt der Inokulation der Hauptkultur. Der Vergleich der Wuchskurven (Abb. 4.2) verdeutlicht, dass die Lag-Phase im Wachstum der Hauptkultur vermieden wurde, wenn eine maximale optische Dichte der Vorkultur von 0,6 nicht überschritten wurde (Abb. 4.2B). War das Wachstum der Zellen der Vorkultur bereits über diesen Punkt hinaus fortgeschritten, so zeigte die Hauptkultur ein langsameres exponentielles Wachstum und einen um 3 h verzögerten Übergang zur Stationärphase (Abb. 4.2A).



$OD_{600\ VK2}$ = 0,68
μ = 0,396 h^{-1}
T_D = 105 min

$OD_{600\ VK2}$ = 0,57
μ = 0,708 h^{-1}
T_D = 59 min

Abb. 4.2: Wuchsverhalten von *B. subtilis* 168 in Abhängigkeit der optischen Dichte der Vorkultur. Wenn die Vorkultur zum Zeitpunkt der Inokulation der Hauptkultur eine optische Dichte von über 0,6 aufwies (A), verlangsamte sich die Wuchsrate der Hauptkultur. Hatten die Zellen der Vorkultur die optische Dichte von 0,6 noch nicht erreicht, erfolgte das Wachstum der Hauptkultur deutlich schneller und eine Lag-Phase wurde vermieden (B).

4.3 Vergleich des Wuchsverhaltens von Wildtyp und Δ*xylR*-Mutante

Um die Vorgaben der SOP bezüglich der Wuchsrate zu erfüllen, war es notwendig, das Wuchsverhalten der in dieser Studie verwendeten Deletionsstämme mit dem des Wildtyps *B. subtilis* 168 zu vergleichen. Bei entsprechenden Wuchsexperimenten konnte kein Unterschied in Wuchsverhalten und -geschwindigkeit festgestellt werden (Abb. 4.3). Somit konnten die erstellten Δ*xylR*-Stämme im Rahmen des SysMO-Projektes eingesetzt werden.

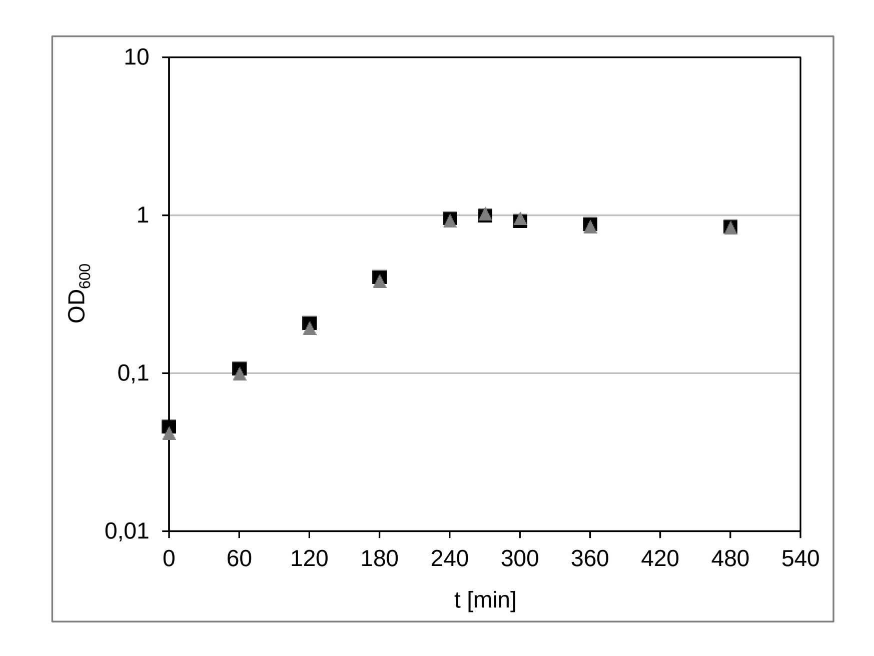


Abb. 4.3: Wuchsverhalten von *B. subtilis* 168 (WT, ■) und *B. subtilis* WH1117 (*xylR*::*erm*, ▲). Die Insertion der Erythromycinresistenzkassette beeinflusste die Wuchsrate von *B. subtilis* nicht. *B. subtilis* WH1117 erfüllte damit die Kriterien der SOP bezüglich der Wuchsrate und konnte im Rahmen der Analysen im SysMO–Projekt eingesetzt werden.

4.4 Etablierung der absoluten Quantifizierung intrazellulärer Transkriptmengen

Die zeitaufgelöste absolute Quantifizierung intrazellulärer mRNA ermöglicht Aussagen über die Geschwindigkeit des Transkriptauf- und abbaus. Aktuell sind die dafür notwendigen qPCR-Systeme, welche auch unabhängig von Änderungen des physiologischen Zustandes der Bakterienzelle anwendbar sind und auf einer externen Standardkurve basieren, für bakterielle Systeme kaum beschrieben. Daher erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Entwicklung eines spezifischen, sensitiven und stabilen Messsystems für die Quantifizierung der Transkripte von *xylA* und *xynP* in *B. subtilis*. Dazu wurde ein One-Step System verwendet, bei dem Reverse Transkription und quantitative real-time PCR in einem Reaktionsgefäß direkt nacheinander ablaufen. Die real-time PCR basiert auf der Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR® Green an doppelsträngige Nukleinsäure. Die Detektion der

Fluoreszenz während der Amplifikation ermöglicht die Bestimmung des PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenzkurve den Schwellenwert der Hintergrundfluoreszenz überschreitet und exponentiell ansteigt. Dieser als C_q-Wert bezeichnete Quantifizierungszyklus ist ein Maß für die Menge der detektierten mRNA in der Probe. Im ersten Schritt erfolgte die Optimierung der Präparation der Gesamt-RNA, um eventuelle Verluste so gering wie möglich zu halten. Anschließend erfolgten die Optimierung der Oligonukleotide für die Reverse Transkription sowie der real-time PCR und deren Annealingtemperatur, um eine gleichbleibend hohe Effizienz der qPCR-Reaktion zu gewährleisten. Im dritten Schritt wurden die Plasmide für den Einsatz als externe Standardkurve konstruiert und deren Eignung als Templat in den RT-qPCR-Experimenten nachgewiesen.

4.4.1 Optimierung der RNA-Präparation

4.4.1.1 Restriktion chromosomaler DNA mit DNase I

Um Verfälschungen der Quantifizierung der Transkripte durch Rückstände chromosomaler DNA in der präparierten Gesamt-RNA zu vermeiden, wurde eine zusätzliche Restriktion mit DNase I während der RNA-Präparation durchgeführt. Hierfür wurden die beiden Methoden der DNase-Behandlung auf der Säule und im Flüssigansatz nach der Aufreinigung miteinander verglichen. Dazu wurde die Gesamt-RNA äquivalenter Proben präpariert (siehe Punkt 3.7.8) und mittels beider Techniken der Restriktion mit DNase I unterzogen. Anschließend wurden in den Gesamt-RNA-Proben mittels der unter Punkt 3.7.9.3 beschriebenen qPCR sowie der unter Punkt 3.7.9.4 beschriebenen RT-qPCR die *xylA*-Transkripte detektiert. Die Differenz der C_q-Werte in den Ansätzen mit und ohne reverse Transkriptase ermöglichte die Ermittlung des Verhältnisses von mRNA zu DNA-Rückstand. Diese Differenz liegt bei der Behandlung mit DNase I im Flüssigansatz etwa bei 10^4 und damit um den Faktor 10 höher als im Falle der Restriktion auf der Säule.

Letzterer erreicht jedoch eine dreifach höhere Ausbeute an Gesamt-RNA. Daher wurde bei allen nachfolgenden RNA-Präparationen eine Behandlung mit DNase I auf der Säule wie unter Punkt 3.7.8 beschrieben durchgeführt, um DNA-Rückstände auf etwa ein Tausendstel der mRNA-Menge zu reduzieren und den RNA-Verlust möglichst gering zu halten.

4.4.1.2 RNA-Elution von den Siliziumdioxid-Säulchen

Die Verwendung Siliziumdioxid-basierter Minisäulchen für die Präparation von Gesamt-RNA führt meist zu sauberen RNA-Lösungen. Es kann jedoch zu deutlichen RNA-Verlusten kommen, da erhebliche Mengen RNA während der Elution am Säulchenmaterial gebunden bleiben. Um zu überprüfen, mit welcher Elutionsstrategie diese Verluste verringert werden können, wurde die Gesamt-RNA äquivalenter Proben (siehe Punkt 3.7.6.3) von mittlerer exponentieller und stationärer Phase sowie vom Transitionspunkt mit der unter Punkt 3.7.8 beschriebenen Methodik und der optimierten Restriktion mit DNase I (Punkt 4.4.1.1) präpariert. Die Elution wurde anschließend mittels drei verschiedener Techniken durchgeführt: Variante (A) entspricht der Anleitung des Herstellers, bei Variante (B) wurde viermal 30 µl H_2O_{RNA} je zweimal auf die Säule geladen und Variante (C) entspricht 10 Volumina mit je 30 µl H_2O_{RNA}. Bei Mehrfacheluaten wurden die einzelnen Fraktionen getrennt gesammelt, die RNA-Konzentration der einzelnen Fraktionen bestimmt und die RNA-Menge anschließend aufsummiert. Dabei zeigte sich, dass die Elutionsmethode nach Herstellerangaben zu einem deutlichen Verlust an Gesamt-RNA führte und die Technik des Doppeleluats die größte Ausbeute an Gesamt-RNA ermöglichte (Tab. 4.1). Somit wurde die Elution bei allen nachfolgenden RNA-Präparationen mittels Doppeleluaten durchgeführt.

Tab. 4.1: Gesamtmenge RNA aus 5 OD-Äquivalenten *B. subtilis* in Abhängigkeit der Elutionsmethodik bei der Präparation der Gesamt-RNA

	Nach Hersteller-angaben (50 µl)	Doppeleluat (4x 30 µl)	Einzeleluat (10x 30 µl)
Exponentielle Phase	17,7 µg	30,49 µg	26,74 µg
Transitionspunkt	10,36 µg	20,88 µg	20,56 µg
Stationäre Phase	4,4 µg	9,06 µg	7,73 µg

4.4.2 Optimierung der Oligonukleotide für die RT-qPCR von *xylA*

Die Optimierung der Oligonukleotide sowohl für die genspezifische Reverse Transkription (RT) als auch die nachfolgende qPCR ist bei Verwendung SYBR® Green-basierter Systeme unverzichtbar für spezifische und hocheffiziente PCR-Reaktionen, da SYBR® Green unspezifisch an alle doppelsträngigen Nukleinsäuren bindet und diese somit detektiert. Die Optimierung der Oligonukleotide für die Quantifizierung von *xylA* erfolgte im ersten Schritt über eine RT-qPCR (siehe Punkt 3.7.9.4) mit den Oligonukleotiden rtPCR_xylAfwd6 und rtPCR_xylArev6 sowie cDNA_xylArev. Dabei dienten verschiedene Verdünnungen einer Gesamt-RNA-Probe als Templat. Bei der Überprüfung des Produktes auf einem 5 % Agarosegel zeigten sich Mehrfachbanden. Die Schmelzkurvenanalyse wies jedoch keine multiplen Signale auf (Abb. 4.4A), welche auf zusätzliche unspezifische PCR-Produkte hingewiesen hätten. Weitere qPCR-Ansätze ließen den Schluss zu, dass diese Mehrfachbanden nur in Reaktionen auftraten, die das genspezifische RT-Oligonukleotid cDNA_xylArev enthielten. Daraufhin wurden in vergleichbaren RT-qPCR-Experimenten weitere cDNA-

Oligonukleotide getestet, wobei die bereits verwendeten qPCR-Primer und die Annealingtemperatur von 59°C beibehalten wurden

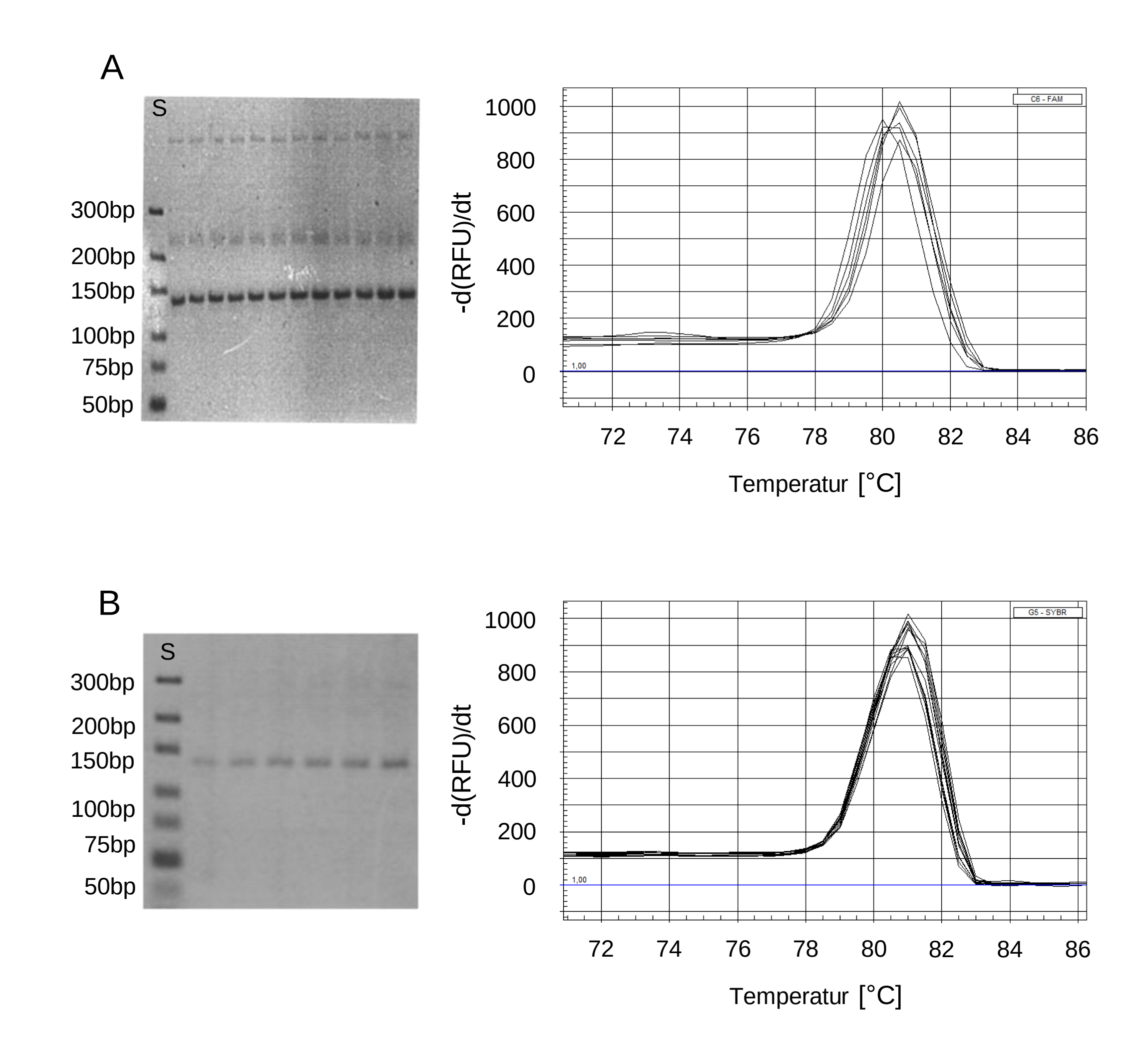


Abb. 4.4: Gel- und Schmelzkurvenanalyse des RT-qPCR-Produktes von *xylA* bei Verwendung des RT-Oligonukleotids cDNA_xylArev (A) und cDNA_xylA3 (B). Auf dem 5 %igen Agarosegel sind die PCR-Produkte der RT-qPCR der verschiedenen Verdünnungsstufen sowie in der linken Spur der Ultra Low Range DNA-Standard aufgetragen. Bei Verwendung von cDNA_xylArev traten Mehrfachbanden auf, wohingegen die Schmelzkurvenanalyse keine multiplen Signale zeigte, die auf zusätzliche PCR-Produkte schließen ließen (A). Der Wechsel des Oligonukleotids für die Reverse Transkription zu cDNA_xylA3 resultierte in spezifischen singulären Signalen in der Gel- und der Schmelzkurvenanalyse (B).

Anschließend wurde die PCR-Effizienz aus den C_q-Werten der Verdünnungsstufen bestimmt. Die Spezifität der Produkte wurde mittels

Schmelzkurven- und Agarosegelanalyse untersucht. Basierend auf diesen Analysen wurde für alle weiteren RT-qPCR-Experimente die Kombination aus dem qPCR-Primerpaar rtPCR_xylA6 und dem genspezifischen RT-Primer cDNA_xylA3 bei einer Annealingtemperatur von 59°C gewählt, da hierbei die Mehrfachbanden in der Agarosegelanalyse verhindert wurden (Abb. 4.4B) und die Reaktion eine Effizienz von nahezu 100 % aufwies.

4.4.3 Optimierung der Oligonukleotide für die RT-qPCR von *xynP*

Die Optimierung der Oligonukleotid-Kombination und der Annealingtemperatur erfolgte basierend auf den Erfahrungen der Optimierung des *xylA*-Systems über umfassende RT-qPCR-Experimente. Dabei wurde pro Untersuchung jeweils die Paarung eines Oligonukleotid-Paares der qPCR mit je einem der 4 RT-Oligonukleotide im Reaktionsmix verwendet. Für die Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur wurden RT-qPCR-Ansätze mit Temperaturgradient durchgeführt und Verdünnungsreihen von Gesamt-RNA als Templat eingesetzt. Die jeweilige PCR-Effizienz der Kurven wurde berechnet, wobei die lineare Korrelation bei allen Verdünnungsreihen zwischen 0,996 und 1 lag (Tab. 4.2, 4.3). Die Analyse belegte, dass das Primerpaar rtPCR_xynP2 kombiniert mit cDNA_xynP3 bei einer Annealingtemperatur von 57°C eine optimale PCR-Effizienz aufwies (Tab. 4.3).

Tab. 4.2: PCR-Effizienzen [%] bei Verwendung des qPCR-Primerpaars rtPCR_xynP1

cDNA-Primer	cDNA_xynP1	cDNA_xynP2	cDNA_xynP3	cDNA_xynP4
$T_{Annealing}$				
59,7°C	87,8	92,4	84,8	80,7
59,5°C	84,0	85,7	81,0	74,0
58,9°C	91,2	98,7	82,4	81,5
58,0°C	82,7	84,0	79,6	78,4
56,7°C	91,3	83,8	79,9	78,8
55,8°C	87,8	87,4	78,8	76,4
55,2°C	86,8	85,0	77,4	76,4
54,7°C	89,9	79,2	87,3	77,6

Tab. 4.3: PCR-Effizienzen [%] bei Verwendung des qPCR-Primerpaars rtPCR_xynP2. Die **markierte** PCR-Effizienz entspricht dem für alle weiteren Experimente verwendeten Oligonukleotid und der Annealingtemperatur.

cDNA-Primer	cDNA_xynP1	cDNA_xynP2	cDNA_xynP3	cDNA_xynP4
$T_{Annealing}$				
60,7°C	101,5	86,0	138,6	89,7
60,4°C	98,8	100,1	788,3	88,2
59,7°C	104,5	98,9	94,4	89,2
58,6°C	105,1	102,8	129,9	93,9
57,1°C	102,6	86,0	**99,4**	89,5
56,0°C	102,5	102,6	82,6	89,1
55,2°C	102,7	102,8	92,1	87,9
54,7°C	104,6	94,1	88,8	93,8

4.4.4 Klonierung der Plasmide pWH2348 (*xynP*) und pWH2349 (*xylA*)

Die Quantifizierung absoluter mRNA-Mengen in einer RT-qPCR-Reaktion basierte auf dem Mitführen einer Verdünnungsreihe des entsprechenden Standardplasmids mit bekannten Konzentrationen. Die daraus erstellte Standardkurve diente der Berechnung der detektierten Transkriptmenge pro eingesetzte Templatmenge. Für die Erstellung der Standardkurve der Quantifizierung von *xylA* wurde das Plasmid pWH2349 konstruiert. Dazu wurde ein 408 bp großes Fragment des 3'-Endes des chromosomalen *xylA* von *B. subtilis* 168 mittels der Oligonukleotide NST_xylAfwdEco und NST_xylArevBam amplifiziert. Nach der Restriktion des PCR-Produktes und des Vektors pHT304 mit EcoRI und BamHI sowie anschließender Ligation wurde *Escherichia coli* DH5α mit dem erhaltenen Plasmid transformiert. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung mit dem Oligonukleotid pHT304Seq_mcs überprüft. Für die Konstruktion von pWH2348 als Standardplasmid für die Quantifizierung der *xynP*-mRNA wurde ein 558 bp großes Fragment des 3'-Endes des chromosomalen *xynP* mit den Oligonukleotiden NST_xynPfwdEco und NST_xynPrevBam amplifiziert. Die weiteren Schritte der Klonierung und der Überprüfung des Plasmids erfolgten analog zu pWH2349. Abschließend wurde die Konzentration jedes Standardplasmids auf eine Kopienzahl von 10^{10} Kopien pro µl eingestellt und in Aliquots von 200 µl bei -20°C gelagert, welches jeweils nur einmal verwendet wurde.

4.4.5 Etablierung der externen Standardkurve der RT-qPCR für *xylA*

Die Etablierung der Standardkurve für die *xylA*-Quantifizierung unter Verwendung von pWH2349 als Matrize erfolgte über einen Bereich von 10^{11}

bis 10 Kopien pro Ansatz. Der Reaktionsmix entspricht der unter Punkt 3.7.9.2 beschriebenen Zusammensetzung. Die aus der RT-qPCR resultierenden C_q-Werte wurden als Funktion der Kopienzahl aufgetragen und daraus die Detektionsgrenzen bestimmt (Abb. 4.5). Die untere Detektionsgrenze wurde mit 10 Kopien pro Ansatz erreicht, die obere Detektionsgrenze wurde mit 10^{10} Kopien pro Ansatz definiert, da die eingesetzte Höchstmenge von 10^{11} Kopien nicht mehr detektiert werden konnte. Die PCR-Effizienz wurde aus der Steigung der Geraden berechnet und erreichte 95 % sowie eine lineare Regression von 0,998.

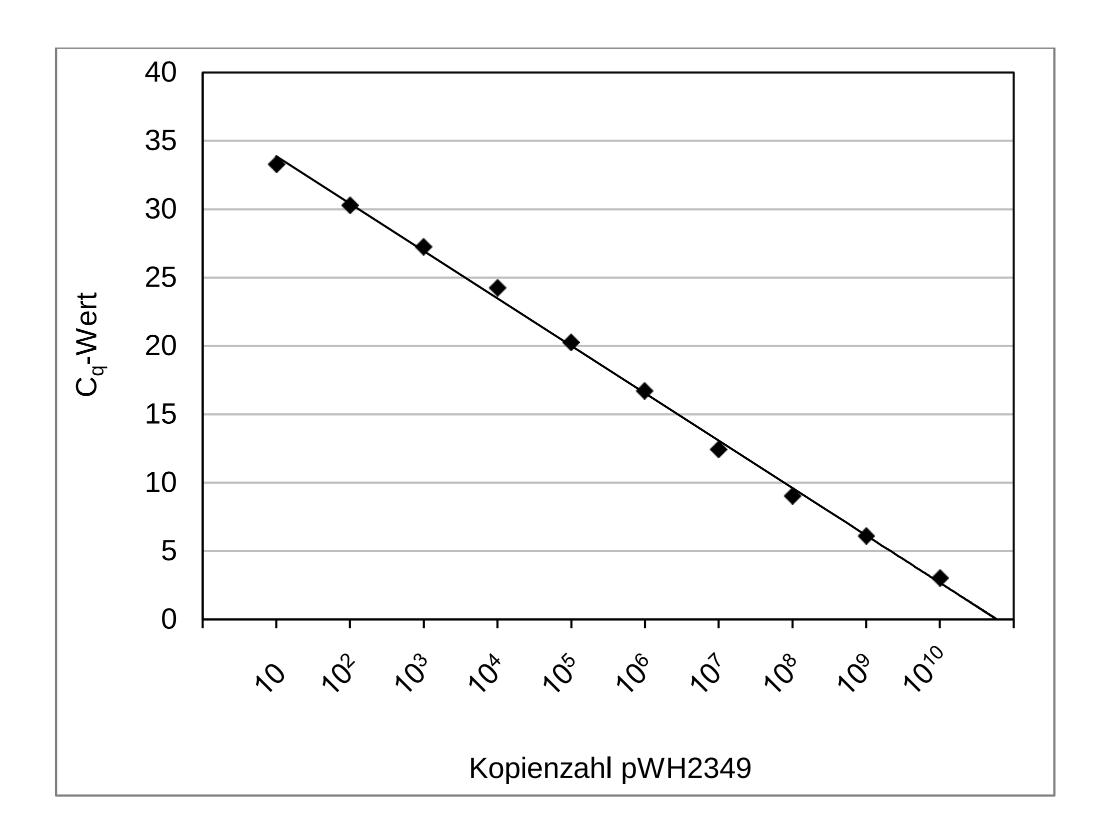


Abb. 4.5: Standardkurve von pWH2349 (*xylA*). Die Auftragung der durch die qPCR ermittelten C_q-Werte der Verdünnungsstufen des Standardplasmids pWH2349 als Funktion der eingesetzten Kopienzahl ermöglicht die Berechnung der PCR-Effizienz von 95 %. Innerhalb der Detektionsgrenzen von 10^{10} bzw. 10 Kopien pro Ansatz steht damit ein System für die Quantifizierung von *xylA*-mRNA zur Verfügung.

4.4.6 Etablierung der externen Standardkurve der RT-qPCR für *xynP*

Die Validierung der externen Standardkurve für die Quantifizierung der *xynP*-mRNA auf der Basis von pWH2348 erfolgte analog zur Durchführung für *xylA* (siehe Punkt 4.4.5). Die so erstellte Standardkurve erreichte eine PCR-Effizienz von 100 % bei einer linearen Regression von 0,999. Die Detektionsgrenzen wurden mit 10 Kopien sowie 10^9 Kopien pro Ansatz festgelegt (Abb. 4.6).

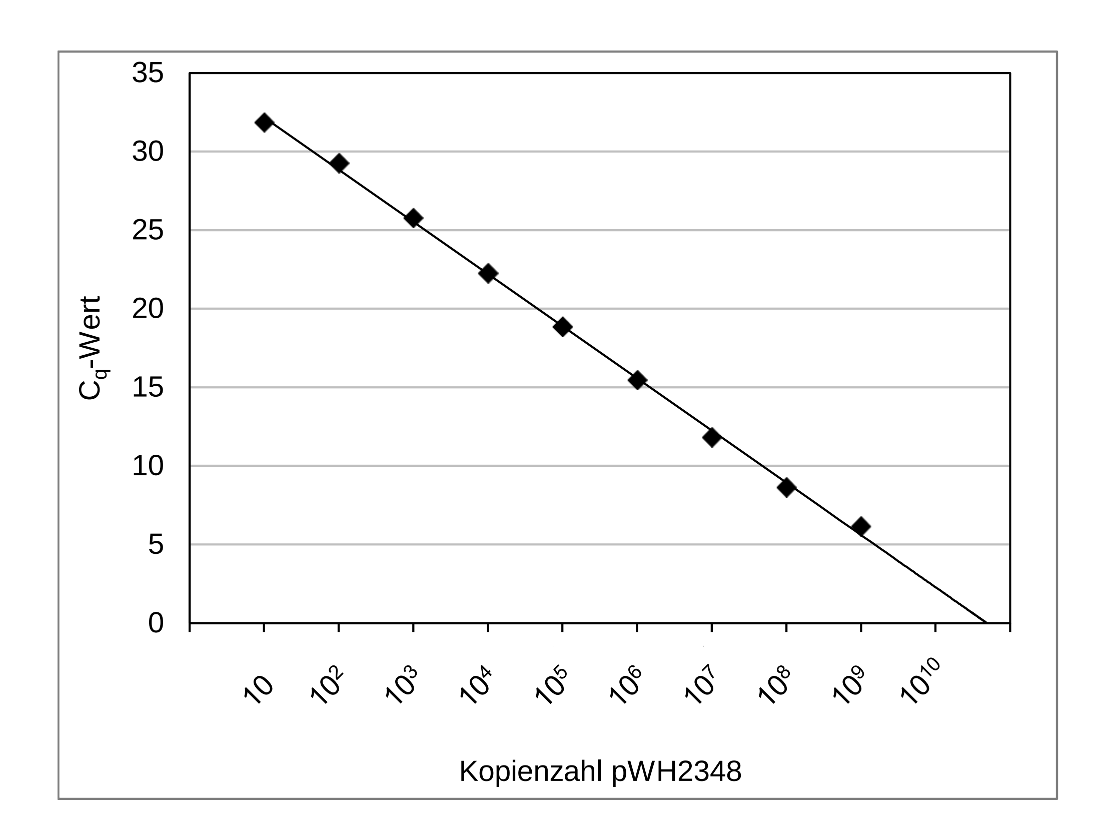


Abb. 4.6: Standardkurve von pWH2348 (*xynP*). Für die Erstellung der Standardkurve erfolgte die Auftragung der C_q-Werte der Verdünnungsstufen als Funktion der eingesetzten Kopienzahl des Plasmids pWH2348. Die ermittelte PCR-Effizienz von nahezu 100 % sowie der breite lineare Messbereich von 10^9 bis 10 Kopien pro Ansatz ermöglicht die Quantifizierung der Transkripte von *xynP*.

4.4.7 Test auf Inhibierung der qPCR durch Reverse Transkriptase

Die Verwendung von sogenannten „One-Step“-Systemen, bei denen die Reverse Transkription und die quantitative real-time PCR in demselben Reaktionsgefäß direkt nacheinander stattfindet, ermöglicht nahezu verlust- und kontaminationsfreies Arbeiten. Jedoch wurde von Chandler *et al.* (1998) eine mögliche Inhibierung der real-time PCR durch die Anwesenheit der reversen Transkriptase diskutiert. Um zu überprüfen, inwieweit ein Hemmeffekt auf die hier beschriebenen PCR-Reaktionen auftritt, wurde exemplarisch für das *xylA*-Messsystem eine vergleichende qPCR jeweils mit (rot) und ohne (schwarz) reverse Transkriptase durchgeführt (Abb. 4.7). Als Matrize diente das Standardplasmid pWH2349. Es konnte kein Einfluss der reversen Transkriptase auf die C_q-Werte der Verdünnungen und damit der PCR-Effizienz nachgewiesen werden (Abb. 4.7).

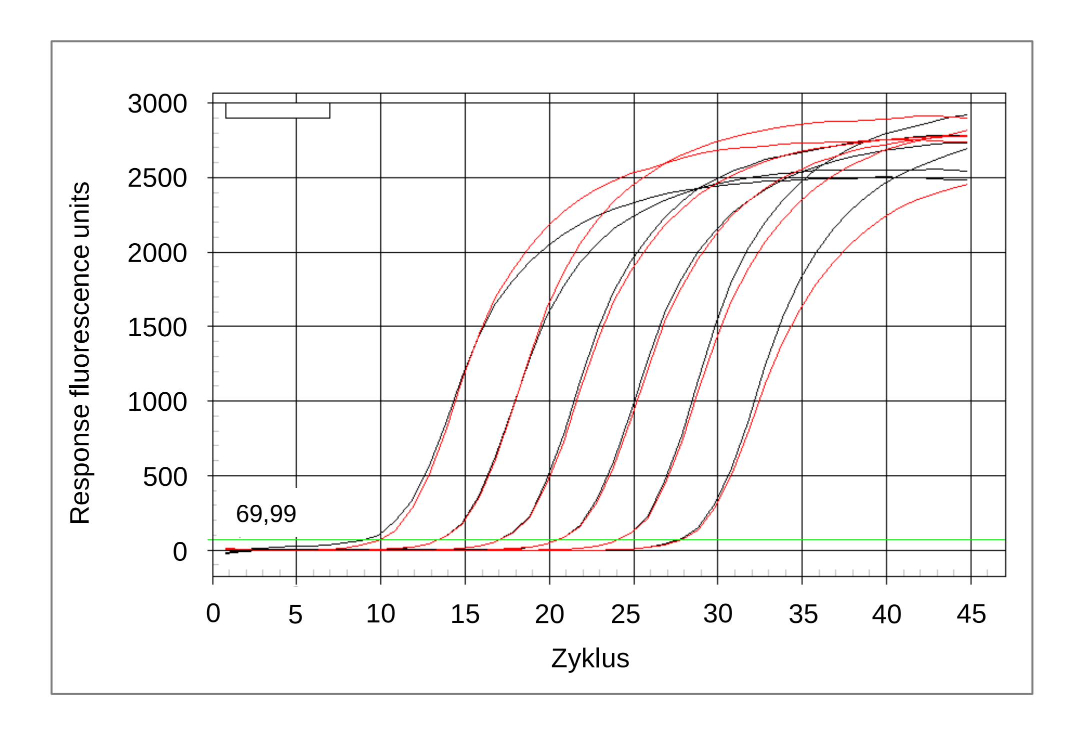


Abb. 4.7: Real-time PCR-Kurve zur Bestimmung des Einflusses der reversen Transkriptase. Als Matrize der PCR dienten 1:10-Verdünnungen von pWH2349. In schwarz sind die PCR-Ansätze ohne, in rot jene mit reverser Transkriptase dargestellt. Hierbei wurde kein signifikanter Unterschied der C_q-Werte festgestellt.

4.5 Konstruktion von *B. subtilis* WH1117 und *B. subtilis* WH1118

Der Einfluss der CcpA-vermittelten Regulation in *B. subtilis* auf die Expression von *xylA* und *xynP* wurde ohne Einfluss des Repressors XylR untersucht. Hierfür wurden die Δ*xylR*-Stämme WH1117 und WH1118 konstruiert. Dazu wurde mittels der Oligonukleotide NSt_pAC6fwBam und NSt_pAC6rvBlp der Bereich des Vektors pAC6 durch PCR amplifiziert, der das Ampicillinresistenzgen *bla* und den Replikationsursprung für *E. coli* trägt. Das Gen *xylR* wurde mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide NSt_xylRfwBam und NSt_xylRrvBlp und chromosomaler DNA von *B. subtilis* 168 als Matrize vervielfältigt. Nach der Restriktion beider PCR-Produkte mit BamHI und BlpI und anschließender Ligation erfolgte die Transformation von *E. coli* DH5α mit dem entstandenen Plasmid pAC6'xylR. Die Kandidaten dieser Transformation wurden auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin selektiert und ausgewählte Kandidaten via Kolonie-PCR verifiziert. Anschließend erfolgte eine Umklonierung des *xylR*-tragenden Bereichs von pAC6'xylR in pBSKII(-). Anschließend wurde in dem so entstandenen Plasmid pWH2341 die jeweilige Resistenzkassette in *xylR* kloniert (Abb. 4.8). Der Ausgangsstamm *B. subtilis* 168 *trp*+ wurde im Anschluss mit den so konstruierten *xylR*-Deletionsplasmiden pWH2342 und pWH2343 transformiert, wobei das chromosomalständige *xylR* durch doppelt homologe Rekombination der plasmidständigen *xylR*-Sequenz unterbrochen wurde. Die Orientierung der chromosomal integrierten Resistenzkassette der entstandenen Stämme *B. subtilis* WH1117 und WH1118 wurde mittels Sequenzierung überprüft (Abb. 4.8).

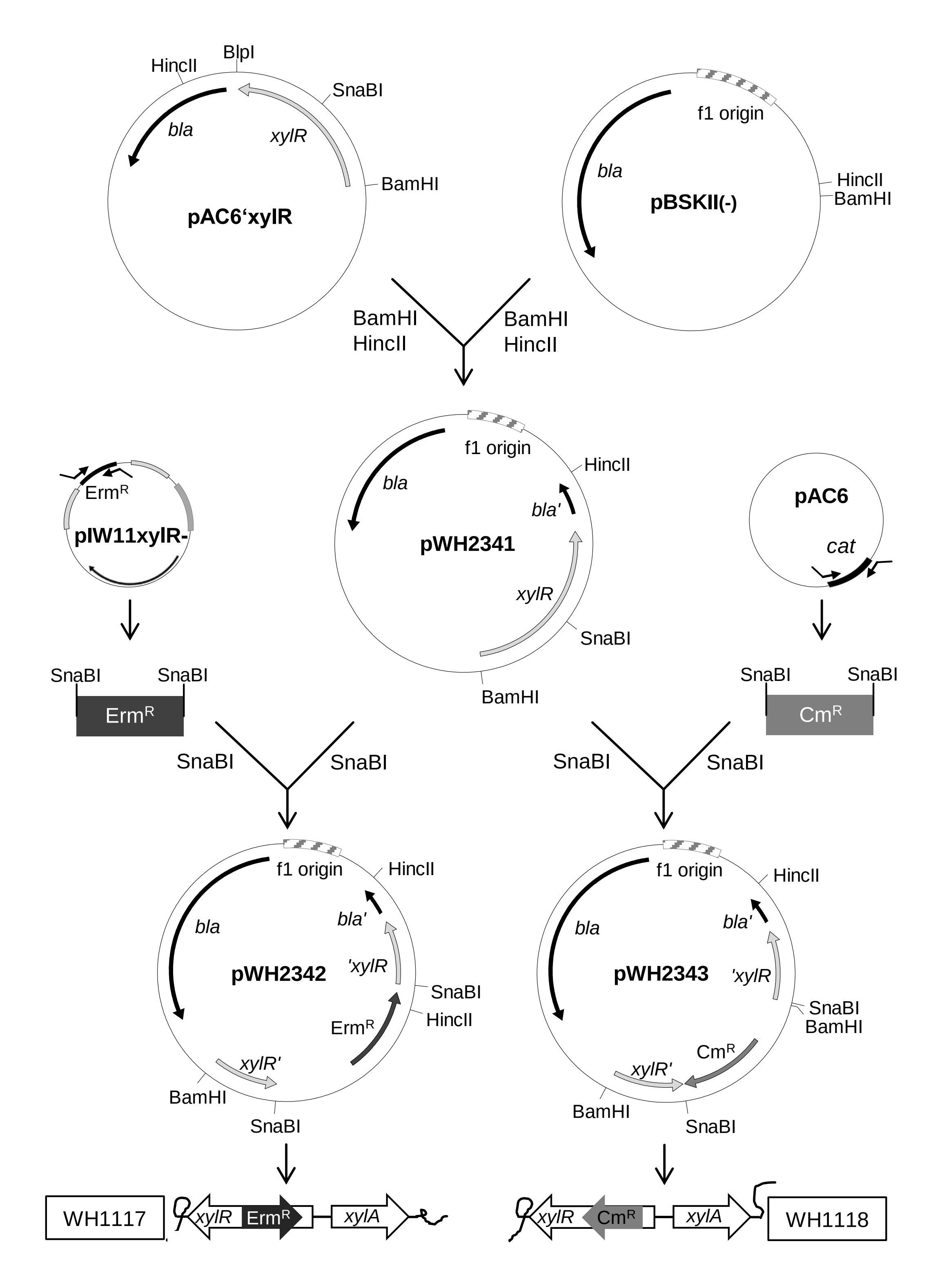


Abb. 4.8: Klonierung der *xylR*-Deletionsstämme *B. subtilis* WH1117 und WH1118. Ausgehend von pAC6'xylR und pBSKII(-) erfolgte die Klonierung von pWH2341 als Basisvektor für die *xylR*-Deletionsplasmide pWH2342 und pWH2343. Durch Transformation von *B. subtilis* 168 *trp*+ mit den neu konstruierten Deletionsplasmiden entstanden die Stämme WH1117 und WH1118, in denen die jeweilige Resistenzkassette das chromosomalständige *xylR* disruptiert. Dabei weisen die Resistenzkassetten bezüglich der Leserichtung von *xylA* eine unterschiedliche Orientierung auf.

4.6 Quantifizierung der intrazellulären mRNA-Menge mittels RT-qPCR

4.6.1 Quantifizierung der *xylA*-mRNA in *B. subtilis* WH1118

Die Quantifizierung der *xylA*-mRNA in *B. subtilis* WH1118 erfolgte mittels der RT-qPCR der Proben von zwei biologischen Replikaten wie unter Punkt 3.7.9 beschrieben. Während des exponentiellen Wachstums wurde ein stabiles Transkriptniveau von 2 bis 3 Molekülen pro KbE detektiert. Unmittelbar nach dem Übergang in die Stationärphase zum Zeitpunkt t=0 stieg die mRNA-Menge in den folgenden 5 h kontinuierlich auf durchschnittlich 8 Transkripte pro KbE an (Abb. 4.9), wobei dies einer etwa dreifachen Erhöhung der intrazellulären Transkriptmenge nach Verstoffwechslung der Glukose entsprach. Diese Transkriptmengen entsprachen bei einem Zellvolumen von *B. subtilis* von 1 fl (Whatmore *et al.*, 1990) einer intrazellulären Konzentration von $4{,}0 \cdot 10^{-9}$ bis $1{,}6 \cdot 10^{-8}$ mol mRNA/l Zytoplasma.

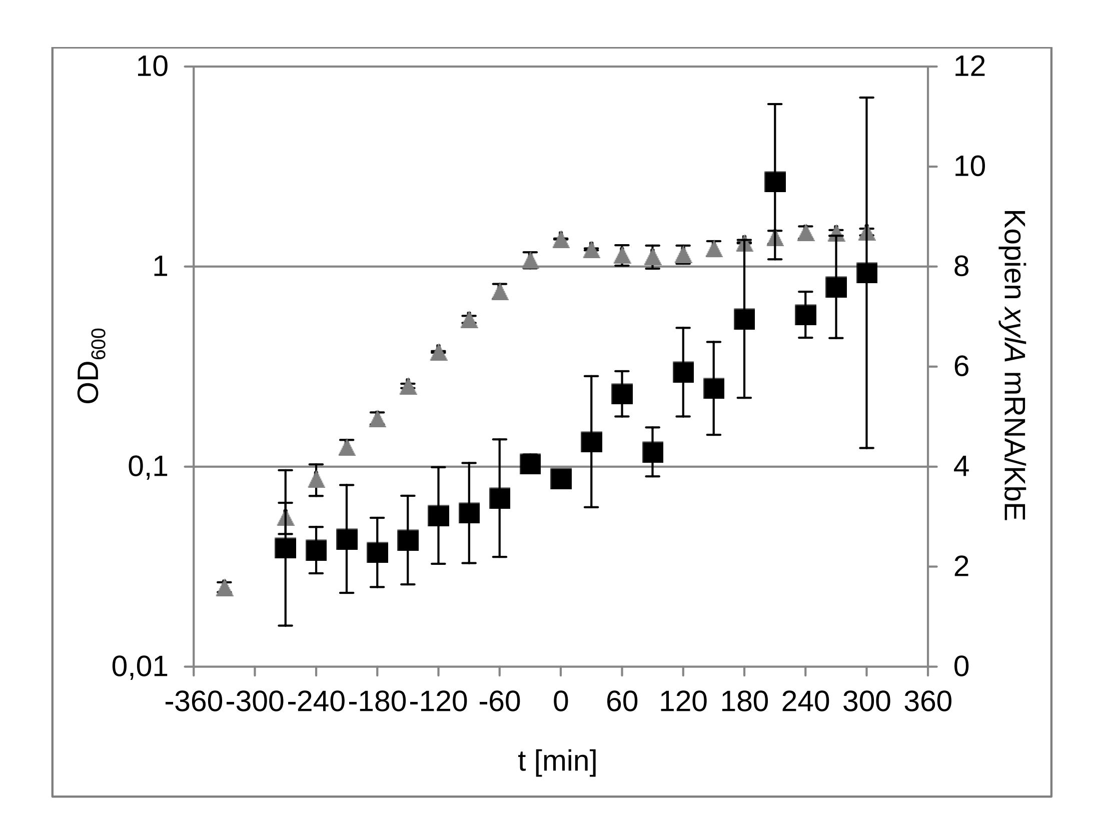


Abb. 4.9: Quantifizierung des intrazellulären *xylA*-Transkripts (■) in *B. subtilis* WH1118 (Δ*xylR*$_{Cm}$) in Abhängigkeit des Zellwachstums (▲). Die detektierte mRNA-Menge pro KbE lag vor Eintritt in die Stationärphase (t<0) bei etwa 2 bis 3 Molekülen und stieg ab dem Zeitpunkt des Übergangs in die Stationärphase (t=0) kontinuierlich auf durchschnittlich 8 Transkripte pro KbE an.

4.6.2 Quantifizierung der *xynP*-mRNA in *B. subtilis* WH1117

Die zeitaufgelöste quantitative Analyse der intrazellulären *xynP*-mRNA in *B. subtilis* WH1117 (Δ*xylR*) erfolgte mit zwei biologischen Replikaten wie unter Punkt 3.7.9 beschrieben. Während des exponentiellen Wachstums auf Glukose (t<0) wurden durchschnittlich 0,1 Transkripte pro KbE detektiert. Nach vollständiger Verstoffwechslung der Glukose ging *B. subtilis* in die Stationärphase über, was mit einem unmittelbaren Anstieg an *xynP*-mRNA auf durchschnittlich 2 Transkripte pro KbE innerhalb der folgenden 3 h einherging (Abb. 4.10). Dies entsprach einer etwa 34-fachen Erhöhung der intrazellulären Transkriptmenge. Im weiteren Verlauf der Stationärphase zeigte sich in den biologischen Replikaten eine diverse Entwicklung der

Transkriptmenge pro KbE. Die detektierten Transkriptkonzentrationen lagen für das durchschnittliche Zellvolumen von *B. subtilis* von 1 fl (Whatmore *et al.*, 1990) im Bereich von $1{,}0*10^{-11}$ bis $3{,}4*10^{-9}$ mol mRNA/l Zytoplasma.

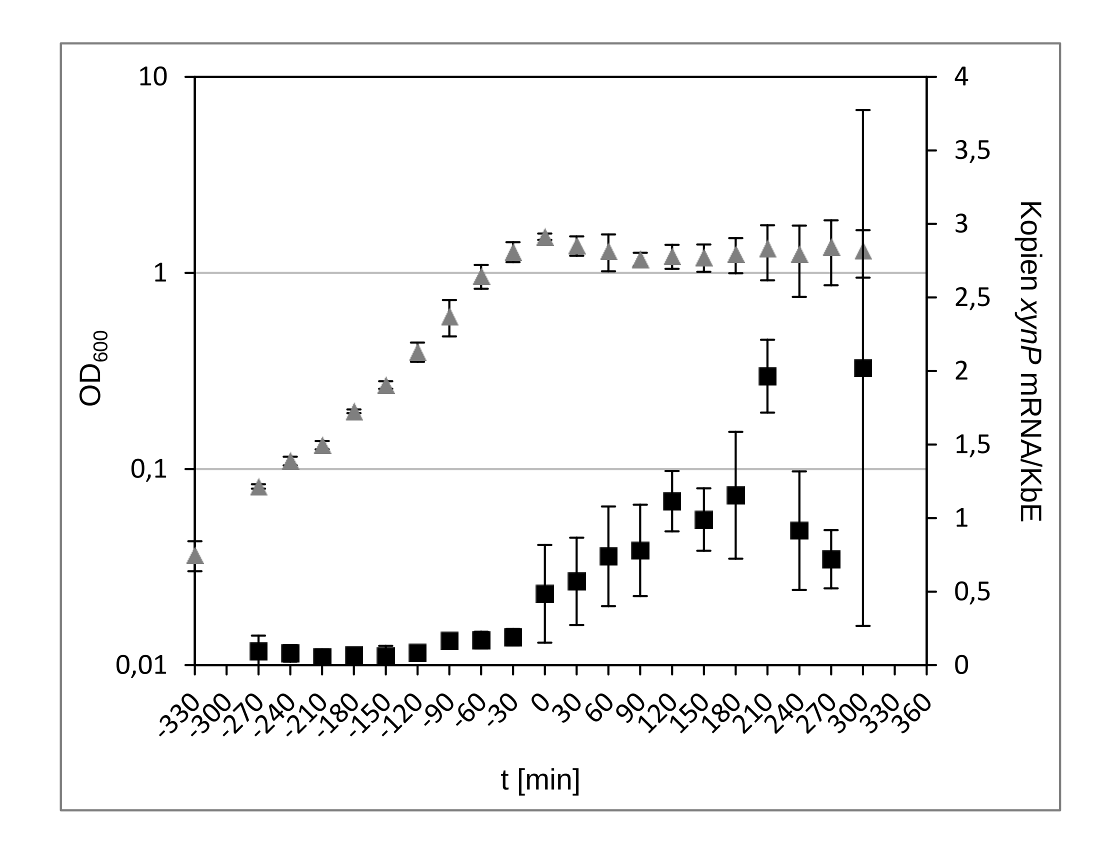


Abb. 4.10: Quantifizierung der Transkriptmenge von *xynP* pro KbE in *B. subtilis* WH1117 (■) während des Zellwachstums (▲). Die Zellen in der exponentiellen Phase (t<0) wiesen je etwa 0,06 bis 0,1 Transkripte auf. Unmittelbar bei dem Übergang in die Stationärphase (t=0) stieg die detektierte Transkriptmenge an und erreichte etwa 3 h nach Beginn dieser Phase ein Niveau von etwa 2 Molekülen pro KbE.

4.7 β-Galaktosidase-Aktivitätsmessungen von *xylA* und *xynP*

4.7.1 β-Galaktosidase-Aktivität von *xylA::lacZ*

Um die Expression einer *xylA::lacZ*-Fusion in einem *B. subtilis*-Stamm mit einer in dieser Studie erstellten *xylR*-Deletion zu vergleichen, wurde mittels Transformation mit pWH484 eine transkriptionelle *xylA::lacZ*-Fusion in das *amyE*-Gen von WH1117 eingebracht. Der daraus resultierende Stamm *B. subtilis* WH1122 wurde in $M9_{SysMO}$ jeweils ohne und mit Zugabe von 0,2 % (w/v) Xylose angezogen und die β-Galaktosidase-Aktivität wurde wie unter Punkt 3.7.12 beschrieben bestimmt. Die β-Galaktosidase-Aktivität der Zellen in $M9_{SysMO}$ jeweils mit und ohne Zugabe von Xylose zeigte keine signifikanten Unterschiede und erreichte während des exponentiellen Wachstums (t<0) etwa 400 Miller Einheiten. Nach dem Übergang in die Stationärphase (t>0) stieg die Aktivität auf rund 600 Miller Einheiten an, was einem Derepressionsfaktor von 1,5 entspricht (Abb. 4.11). Dies ist vergleichbar mit dem etwa dreifachen Anstieg der Transkriptmenge der RT-qPCR-Analysen in *B. subtilis* WH1118 nach dem Übergang zu Glukosehunger.

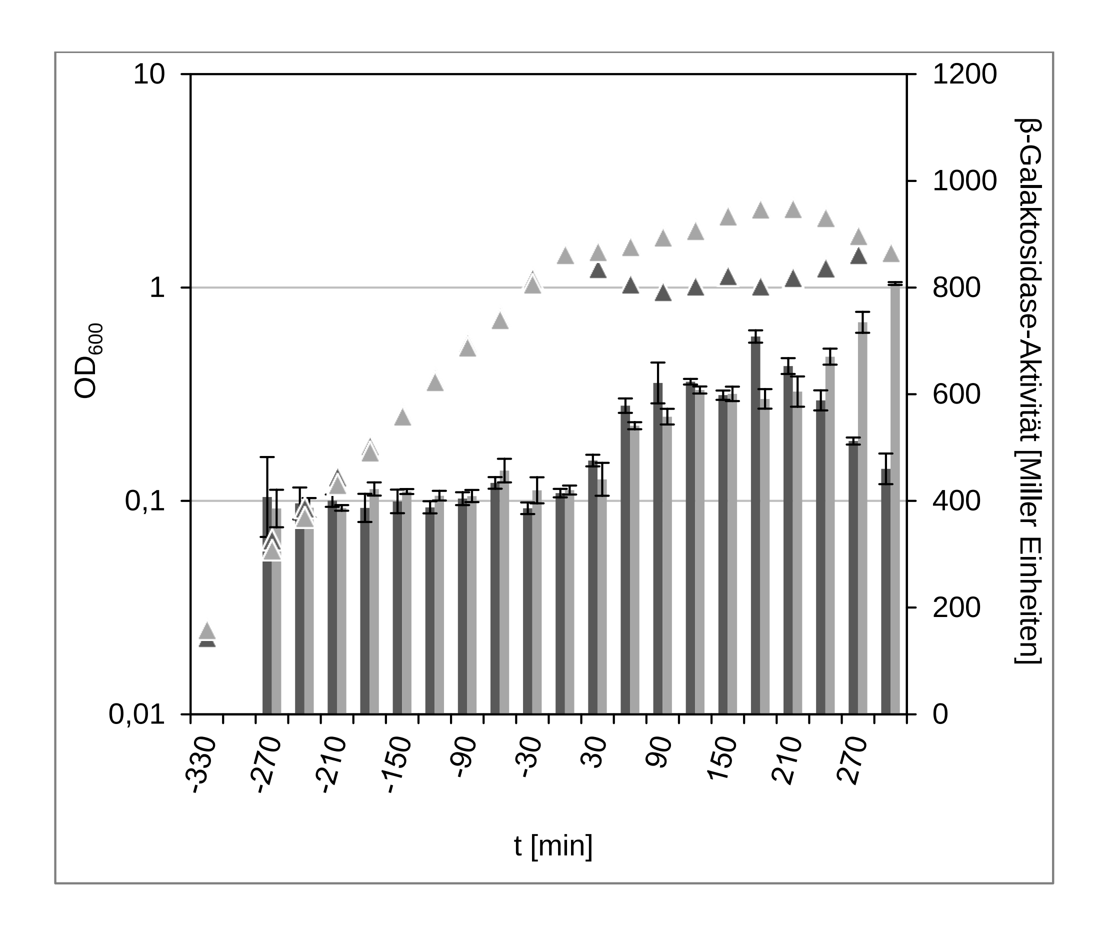


Abb. 4.11: β-Galaktosidase-Aktivität einer *xylA::lacZ*-Fusion in *B. subtilis* WH1122 (Δ*xylR*) in Abhängigkeit des Zellwachstums. Die β-Galaktosidase-Aktivität in $M9_{SysMO}$ ohne und mit Zugabe von 0,2 % Xylose zeigte keinen signifikanten Unterschied. Nach dem Übergang von der exponentiellen Phase in die Stationärphase (t=0) stieg die Aktivität der β-Galaktosidase von etwa 400 Miller Einheiten auf 600 Miller Einheiten an. Dies entspricht einem Derepressionsfaktor von 1,5.

4.7.2 β-Galaktosidase-Aktivität von *xynP::lacZ*

Für die Überprüfung des Expressionsmusters von *xynP*, welches via RT-qPCR ermittelt wurde, erfolgten β-Galaktosidase-Aktivitätsmessungen einer transkriptionellen *xynP::lacZ*-Fusion. Dafür wurden die Stämme *B. subtilis* WH1083 (Δ*xylR*) und WH1084 (WT) verwendet. Die Kultivierung der Zellen wurde nach den Vorgaben der SOP in $M9_{SysMO}$ durchgeführt, wobei dem Medium für die Anzucht des Wildtypstamms WH1084 0,2 % (w/v) Xylose zugegeben wurde. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der β-Galaktosidase-Aktivität wie unter Punkt 3.7.12 beschrieben.

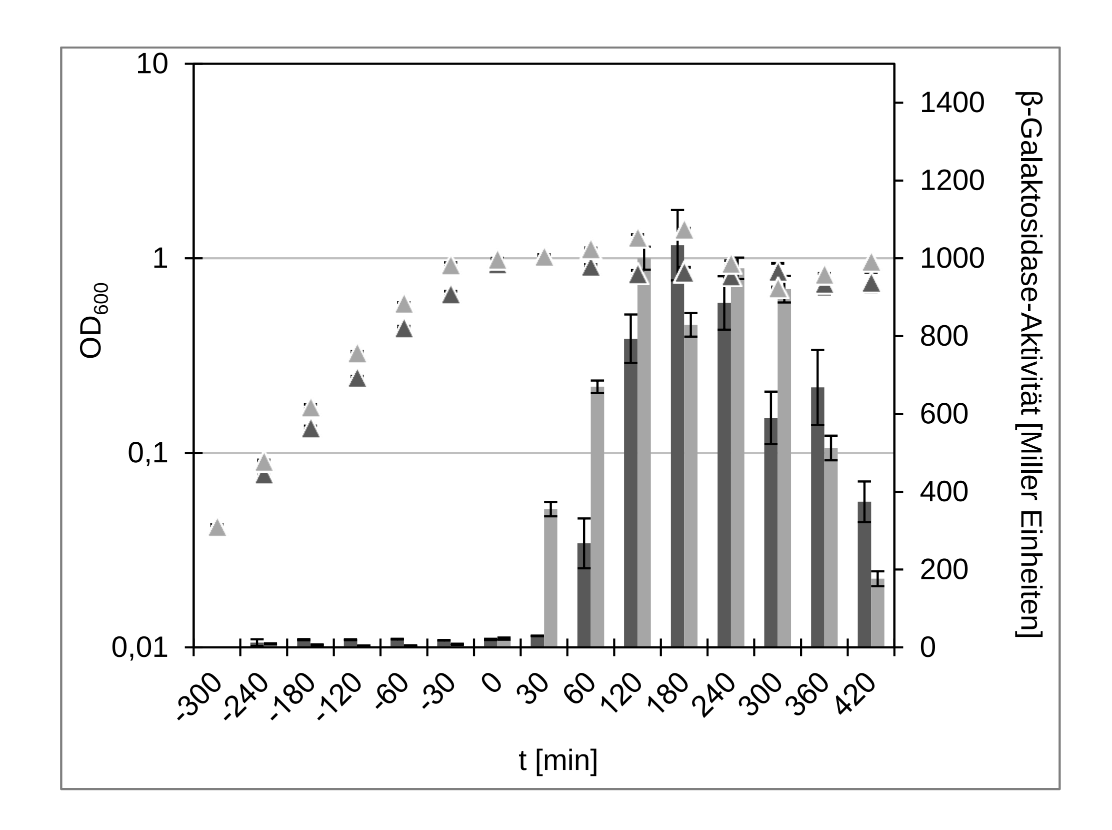


Abb. 4.12: β-Galaktosidase-Aktivitätsmessung einer *xynP::lacZ*-Fusion in *B. subtilis* WH1084 (WT, Zugabe von 0,2 % (w/v) Xylose, hellgrau) und WH1083 ($\Delta xylR_{W23}$, dunkelgrau) in Abhängigkeit des Zellwachstums. Bis zum Übergang von exponentiellem Wachstum in die Stationärphase (t=0) erreichte die β-Galaktosidase-Aktivität in beiden Stämmen höchstens 30 Miller Einheiten, anschließend stieg die Aktivität jeweils innerhalb von 3 h auf 800 bis 1000 Miller Einheiten an.

Der Vergleich beider untersuchter Stämme zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen *B. subtilis* WH1084 (Zugabe von Xylose) und *B. subtilis* WH1083 (Deletion von XylR) (Abb. 4.12). Die Expression von *xynP* wurde während des exponentiellen Wachstums reprimiert, was sich in der niedrigen β-Galaktosidase-Aktivität von maximal zehn Miller Einheiten in WH1084 sowie maximal 30 Miller Einheiten in WH1083 widerspiegelt. Nach vollständiger Verstoffwechslung der Glukose und dem Übergang in die Stationärphase stieg die β-Galaktosidase-Aktivität in beiden Stämmen innerhalb von 3 h auf etwa 800 bis 1000 Miller Einheiten an. Das entspricht einer etwa 40-fachen Erhöhung der Expression. Diese ist vergleichbar mit dem Induktionsfaktor der mittels der RT-qPCR bestimmt wurde.

4.8 RNA-Hybridisierung zur Detektion des *xynP*-Transkripts

Die Validierung der absoluten Quantifizierung der Transkriptkonzentrationen mittels RT-qPCR erfolgte zusätzlich zu β-Galaktosidase-Aktivitätsmessungen über eine Analyse per RNA-Hybridisierung. Die Auflösung und die Sensitivität dieser Methode sind geringer als die RT-qPCR. Aufgrund des nur etwa dreifachen Anstiegs der *xylA*-Expression nach dem Übergang zu Glukosehunger wurde die RNA-Hybridisierung nur für die *xynP*-Expression durchgeführt. Dazu wurde im ersten Schritt eine hochspezifische RNA-Sonde hergestellt.

4.8.1 Herstellung der genspezifischen RNA-Sonde

Für die hochspezifische Detektion der entsprechenden mRNA wurde aus den PCR-Produkten der real-time PCR-Primer von *xynP* die RNA-Sonde entwickelt. Dazu wurde mithilfe der Primer rtPCR_xynPfwd2 und Sonde_xynP2_T7 das PCR-Produkt für *xynP* amplifiziert. Anschließend wurde die DNA-Matrize in RNA umgeschrieben (siehe Punkt 3.7.11.2, Abb. 4.13).

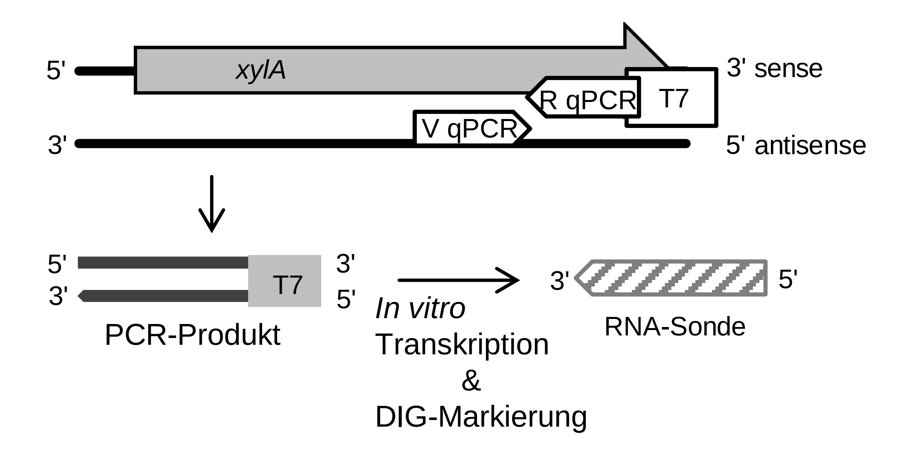


Abb. 4.13: Schematische Darstellung der Konstruktion genspezifischer RNA-Sonden. Mittels der Oligonukleotide der qPCR wurde das hochspezifische PCR-Produkt der real-time PCR, ergänzt um den T7-Promotor am 3'-Ende, amplifiziert und anschließend per *in vitro*-Transkription in RNA umgeschrieben und simultan mit einer Digoxygeninmarkierung versehen.

4.8.2 *In vitro*-Transkript von *xynP* für die Erstellung der Standardkurve der Dot Blot Analyse

Die quantitative Auswertung der RNA-Hybridisierungsexperimente sollte durch die Verwendung einer RNA-basierten Standardkurve auf jeder Membran ermöglicht werden. Für die Herstellung des *xynP*-*in vitro*-Transkripts wurde mittels der Primer NSt_xynPivT und NSt_xynPrevT7 ein 1492 bp großes PCR-Produkt des chromosomalen *xynP* amplifiziert. Die anschließende Herstellung des *in vitro*-Transkripts als Basis für die Standardkurven erfolgte wie unter Punkt 3.7.11.1 beschrieben. Auf der Grundlage der RNA-Konzentration und der molekularen Masse des *in vitro*-Transkripts wurde eine Stammlösung mit 10^{10} Molekülen pro µl hergestellt und in Aliquots von 250 µl bei -20°C gelagert. Jedes Aliquot wurde hierbei nur einmal aufgetaut. Die Erstellung und Detektion einer Standardkurve unter Verwendung oben genannter Aliquots im Abstand von 6 Tagen zeigte jedoch, dass Ansätze derselben *in vitro*-Transkriptmenge nach einer Woche bereits ein deutlich schwächeres Signal zeigten (Abb. 4.14), was zur

Überquantifizierung der mRNA führen würde. Daher wurden die nachfolgenden RNA-Hybridisierungen ausschließlich qualitativ analysiert.

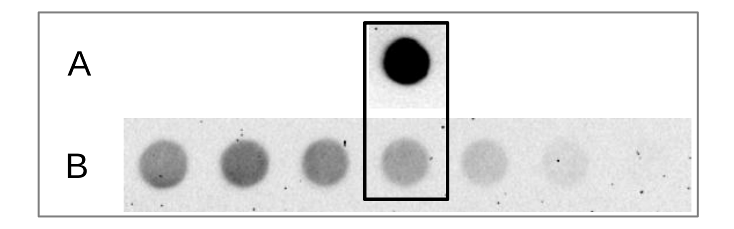


Abb. 4.14: Vergleich der Signalintensität gleicher Kopienzahlen des *in vitro*-Transkripts von *xynP* im Abstand von 6 Tagen. Bei beiden eingerahmten Punkten wurden 10^{11} Kopien aufgetragen, wobei eine Dot Blot-Analyse direkt nach Herstellung des *in vitro*-Transkripts erfolgte (A) und die zweite Membran 6 Tage später mit einem zweiten Aliquot des RNA-Standards erstellt wurde (B). Der große Unterschied in der Signalstärke bei theoretisch gleicher Molekülzahl wies auf den Abbau des *in vitro*-Transkripts hin.

4.8.3 Qualitative Dot Blot-Analyse der *xynP*-Expression

Für die qualitative Untersuchung der *xynP*-Expression mittels RNA-Hybridisierung wurden zur RT-qPCR-Analyse äquivalente Gesamt-RNA-Proben von *B. subtilis* WH1117 verwendet. Die Durchführung des Dot Blots wurde unter Punkt 3.7.11.3 erläutert. Die detektierten Transkriptkonzentrationen zeigten eine Tendenz die mit der Quantifizierung der *xynP*-mRNA mittels RT-qPCR (siehe Abb. 4.10) vergleichbar ist: nach vollständiger Verstoffwechslung der Glukose (t>0) wurde ein deutlicher Anstieg der Transkriptmenge detektiert (Abb. 4.15).

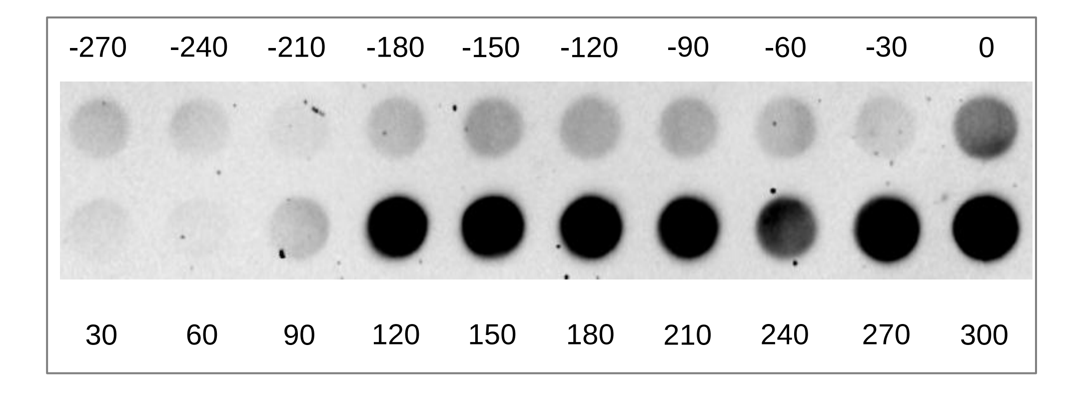
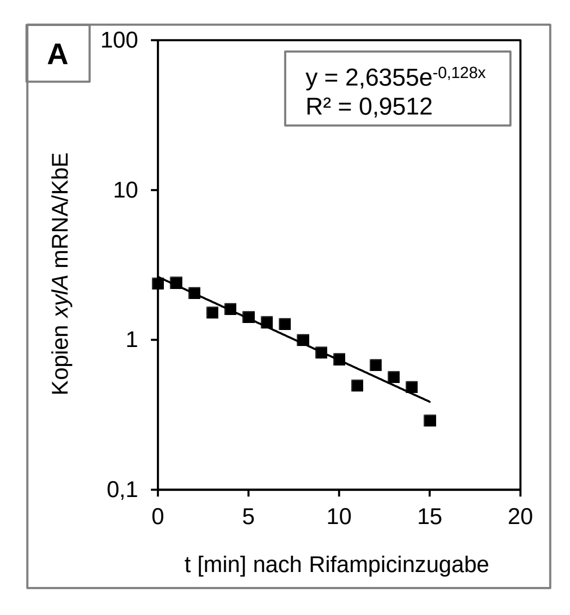


Abb. 4.15: Dot Blot für die Detektion von *xynP* in Abhängigkeit des Zellwachstums. Die Werte über bzw. unter den Punkten entsprechen den Zeitangaben der Probennahme in min, bezogen auf den Übergang zur Stationärphase (t=0). Die Signalstärke der Proben ab 2 h nach diesem Übergang war deutlich erhöht, was einer verstärkten Expression von *xynP* entsprach.

4.9 Bestimmung der Halbwertszeit der *xylA*- und *xynP*-mRNA

Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ von *xylA* wurde 3,5 h nach dem Übergang in die Stationärphase bestimmt. Dazu wurde eine Kultur von *B. subtilis* WH1118 untersucht (siehe Punkt 3.7.10). Hier wurde eine Halbwertszeit von 5 min ermittelt (Abb. 4.16A). Die Bestimmung der Halbwertszeit des *xynP*-Transkripts erfolgte analog zu *xylA* aus zwei unabhängigen Kulturen von *B. subtilis* WH1117. Die mRNA von *xynP* wies eine Halbwertszeit von 2,1 min auf (Abb. 4.16B).



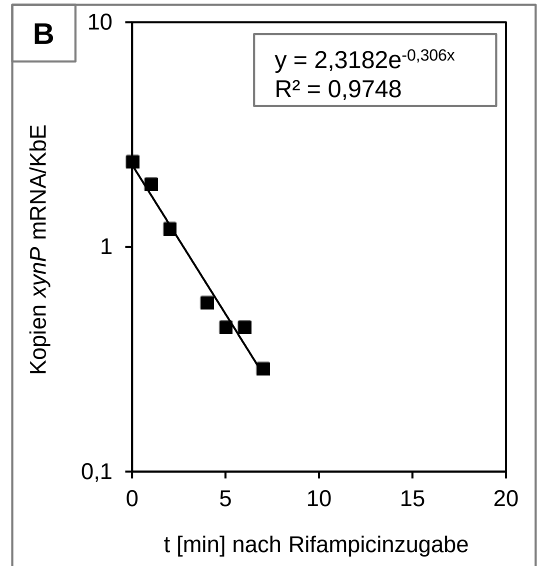


Abb. 4.16: Bestimmung der Halbwertszeit der *xylA*-mRNA in *B. subtilis* WH1117 (A) und der *xynP*-mRNA in WH1118 (B). Die quantifizierten Transkriptmengen wurden gegen die Zeit nach Zugabe von Rifampicin aufgetragen. Aus dem exponentiellen Abfall der Kurve wurde die Halbwertszeit der mRNA berechnet, die für *xylA* 5 min und für *xynP* 2,1 min betrug.

4.10 Berechnung der Auf- und Abbauraten der mRNA von *xylA* und *xynP*

Die Rate der Akkumulierung (schwarz) des jeweiligen Transkripts in der Zelle wurde aus dem Anstieg der Kopienzahl von t=0 bis t=180 min in Abb. 4.9 für *xylA* in *B. subtilis* WH1118 sowie für *xynP* in *B. subtilis* WH1117 in Abb. 4.10 berechnet. Hierbei ergaben sich für *xylA* 1,33 Transkripte pro Stunde und KbE sowie für *xynP* 0,43 Transkripte pro Stunde und KbE. Die Berechnung der Abbaurate (blau) erfolgte aus der Halbwertszeit und belief sich für *xylA* auf 8,4 Moleküle pro Stunde und KbE sowie für *xynP* auf 19,56 mRNA-Moleküle pro Stunde und KbE. Aus diesen beiden Raten wurde die jeweilige Transkriptbildungsrate (rot) für *xylA* bzw. *xynP* von 9,73 bzw. 20 Molekülen pro Stunde und KbE berechnet, die als Differenz aus Transkriptakkumulierung und Transkriptabbau definiert ist.

Damit ergab sich folgendes Ratenverhältnis:

xylA $$1{,}33\ \frac{\text{Transkripte}}{\text{h und KbE}} = 9{,}73\ \frac{\text{Transkripte}}{\text{h und KbE}} - 8{,}40\ \frac{\text{Transkripte}}{\text{h und KbE}}$$

xynP $$0{,}43\ \frac{\text{Transkripte}}{\text{h und KbE}} = 20\ \frac{\text{Transkripte}}{\text{h und KbE}} - 19{,}56\ \frac{\text{Transkripte}}{\text{h und KbE}}$$

4.11 Abhängigkeit der *alsS*-Expression in *B. subtilis* von der Kohlenstoffquelle

4.11.1 Konstruktion von *B. subtilis* WH1078, WH1079 und WH1126

Für die Analyse der Kohlenstoffkatabolitenregulation von *alsS* in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle wurde in verschiedene KKR-defiziente Stämme von *B. subtilis* 168 *trp*- eine transkriptionelle *alsS::lacZ*-Fusion eingebracht. Dazu wurden die Ausgangsstämme *B. subtilis* WH649 (Δ*ccpA*), QB5223 (*ptsH*I) und GP335 (Δ*ccpA*, *ptsH*I) mit dem Plasmid pWH336 transformiert. Die Kandidaten wurden jeweils auf LB-Platten (mit 5 µg/ml Chloramphenicol) selektiert und mittels Stärketest die korrekte Insertion der *lacZ*-Fusion in den *amyE*-Lokus überprüft (siehe Punkt 3.7.4). Die so erzeugten Stämme wurden mit *B. subtilis* WH1078 (Δ*ccpA*, *alsS::lacZ*), WH1079 (Δ*ccpA*, *ptsH*I, *alsS*::*lacZ*) und WH1126 (*ptsH*I, *alsS*::*lacZ*) bezeichnet.

4.11.2 Wuchsphasenabhängige *alsS*-Expression in Minimalmedium mit Glukose

Für die Untersuchung der Expression von *alsS* in Minimalmedium in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle wurde zunächst die Wuchsphase bestimmt, in der *alsS* die höchste Expression aufwies. In bisherigen Untersuchungen wurde die Expression von *alsS* bevorzugt in der Stationärphase ermittelt (Sprehe, 2007). Unter den hier gegebenen experimentellen Bedingungen wurde die höchste β-Galaktosidase-Aktivität jedoch in der späten exponentiellen Phase detektiert (Abb. 4.17). Daher

wurden alle nachfolgenden Untersuchungen in dieser Wuchsphase durchgeführt.

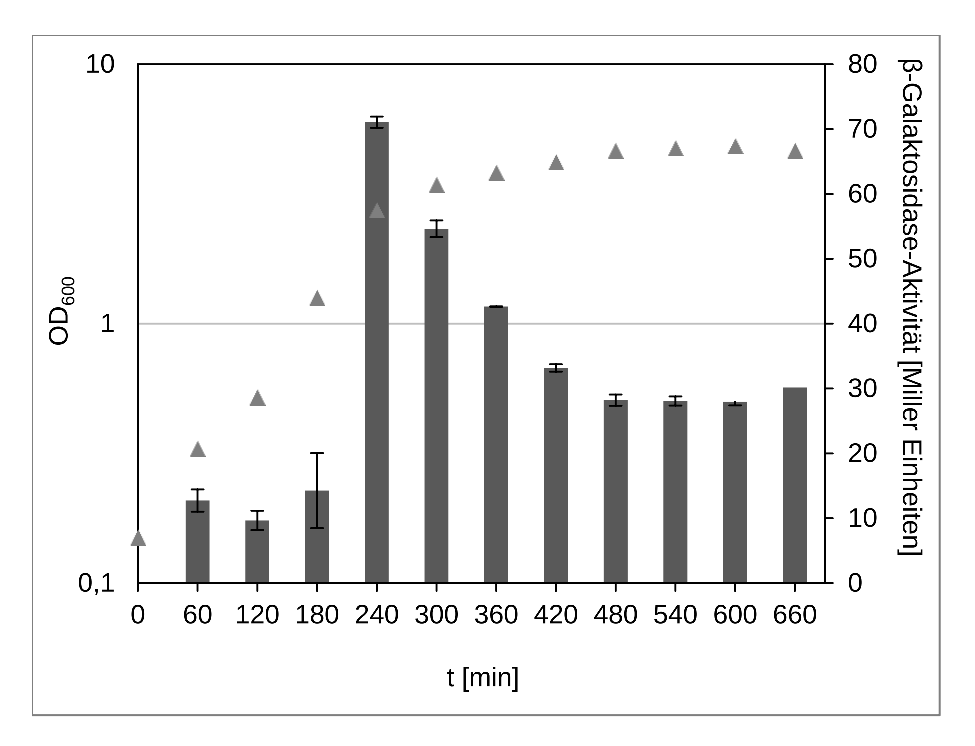


Abb. 4.17: Wuchsphasenabhängige β-Galaktosidase-Aktivität einer *alsS::lacZ*-Fusion in *B. subtilis* WH600. Bei dem Wachstum in Minimalmedium mit 1 % (w/v) Glukose zeigte *alsS* in der spätexponentiellen Phase (t=240 min) die höchste Expression.

4.11.3 Expression von *alsS* in KKR-defizienten Mutanten abhängig von der Kohlenstoffquelle

Die Expression von *alsS* wird von CcpA aktiviert, obwohl das Gen selbst keine *cre*-Sequenz aufweist. Bisher ist dieser indirekte Regulationseffekt nicht geklärt. Vorhergehende Arbeiten von Ludwig *et al.* (2002) gaben Hinweise auf eine indirekte Beteiligung von CcpA über dessen Einfluss auf den Transport der PTS-abhängigen Zucker. Daher wurde die Expression von *alsS* in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen verglichen, die entweder über das Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferasesystem

(PEP-PTS) oder über ein PTS-unabhängiges Transportsystem in die Zelle aufgenommen werden. In allen Messungen wurde Succinat als neutrale Kohlenstoffquelle eingesetzt, die auf die KKR von *alsS* keinen Einfluss hat und als Kontrolle dient.

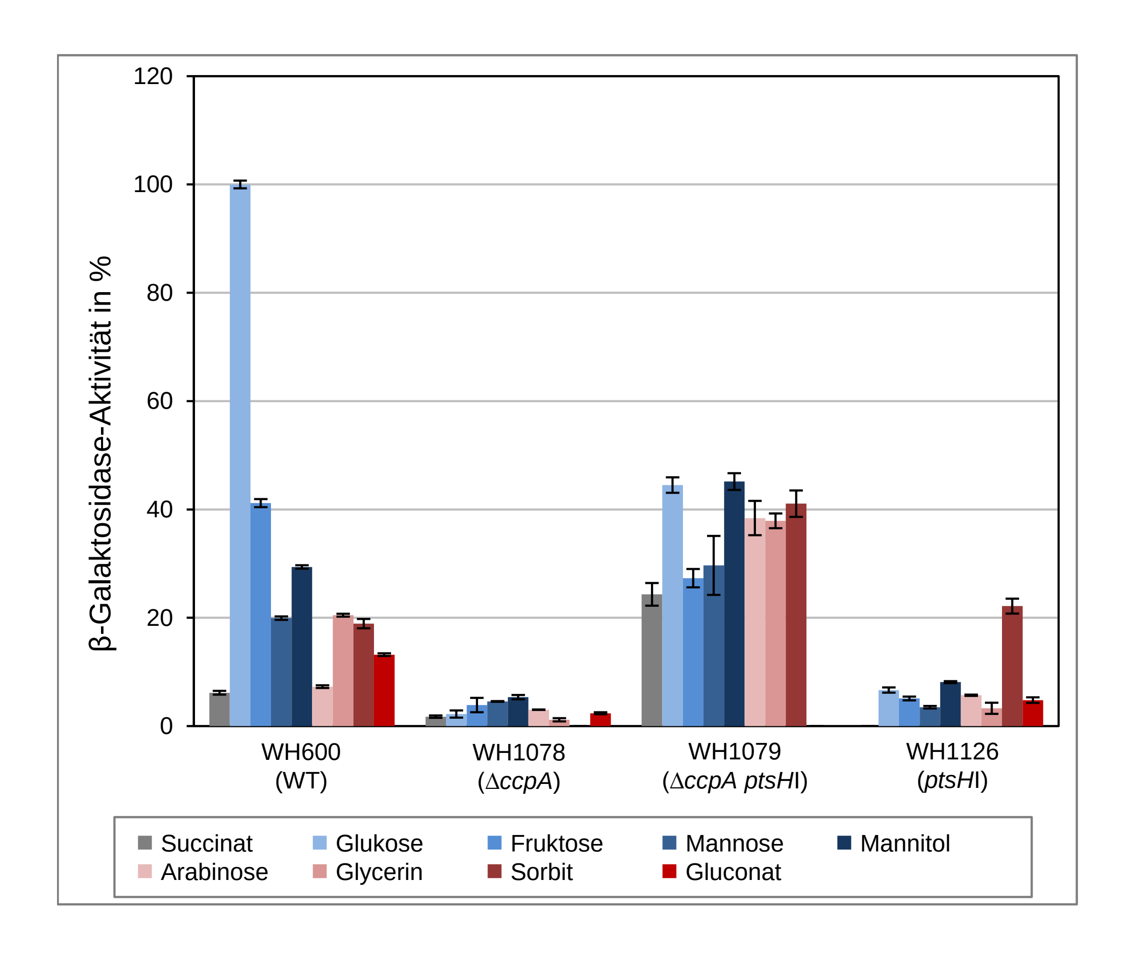


Abb. 4.18: β-Galaktosidase-Aktivität einer *alsS::lacZ*-Fusion in *B. subtilis* in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle. Die Stämme WH600 (WT), WH1078 (Δ*ccpA*), WH1079 (Δ*ccpA*, *ptsHI*) und WH1126 (*ptsHI*) wurden in CSK mit je 1 % (w/v) des entsprechenden Zuckers (blau: PTS-Zucker, rot: nicht-PTS-Zucker) bis zur spätexponentiellen Phase angezogen und die β-Galaktosidase-Aktivität wurde bestimmt. Hierbei zeigt der Wildtyp WH600 eine klare Hierarchie der Kohlenstoffquelle: Glukose (hellblau) aktiviert die *alsS*-Expression am stärksten. Alle weiteren Zucker zeigten diesbezüglich eine Aktivierung von 10 % bis 40 %. Die weiteren untersuchten Stämme WH1078, WH1079 und WH1126 zeigen keine signifikante Reihenfolge der bevorzugten Kohlenstoffquelle und erreichten maximal 45 % der β-Galaktosidase-Aktivität des Wildtyps WH600 in Minimalmedium mit Glukose (hellblau).

Dabei zeigte der Wildtyp *B. subtilis* WH600 bei Wachstum auf Glukose die höchste β-Galaktosidase-Aktivität. Die weiteren untersuchten Kohlenstoff-

quellen erreichten ein Niveau von 7 % bis 40 % bezogen auf Glukose (Abb. 4.18). Im *ccpA*-Deletionsstamm WH1078 wurde unabhängig vom verstoffwechselten Zucker eine *alsS*-Expression von maximal 5 % des Wildtyps mit Glukose detektiert. Im Stamm *B. subtilis* WH1079, der sowohl CcpA- als auch HPrSer46P-defizient ist, wurde eine Aktivierung von *alsS* detektiert, die etwa 25 % bis 45 % der Aktivierung im Wildtyp mit Glukose erreichte. Diese Induktion der *alsS*-Expression erfolgte unbeeinflusst von der eingesetzten Kohlenstoffquelle. Die Untersuchung der Mutante WH1126, deren HPr einen AS-Austausch von Serin 46 zu nicht-phosphorylierbarem Alanin trägt, zeigte ein ähnliches Expressionsverhalten wie die Δ*ccpA*-Mutante: mit Ausnahme des Sorbits erfolgte bei Wachstum auf allen anderen Zuckern eine ebenso niedrige Expression von *alsS*, die maximal 8 % des Wildtyps WH600 mit Glukose erreichte.

5 Diskussion

5.1 Etablierung der absoluten Quantifizierung intrazellulärer Transkriptmengen in *B. subtilis*

Die Reaktion der bakteriellen Zelle auf Umwelteinflüsse wie Hungerstress, Salzstress oder Sporulation spiegelt sich in der Änderung des Expressionsmusters bestimmter Gene wider. Daher ist die Quantifizierung des Transkriptlevels immer stärker in den Fokus der Analyse der Genexpression gerückt. Hierbei hat sich in den letzten Jahren die quantitative PCR (RT-qPCR) etabliert. Man unterscheidet zwischen relativer und absoluter Quantifizierung der Matrize der real-time PCR. Erstere beruht auf der Verwendung eines Referenzgens, dessen Expression von den gewählten Versuchsbedingungen nicht beeinflusst wird (Vandesompele *et al.*, 2002). Diese Methodik ist bei der Analyse bakterieller Genexpression weit verbreitet (Botteldoorn *et al.*, 2006; Chini *et al.*, 2007; Marco & Kleerebezem, 2008; Nielsen & Boye, 2005; Savli *et al.*, 2003; Tasara & Stephan, 2007). Die absolute Quantifizierung basiert auf einer externen Standardkurve mit bekannten Molekülzahlen (Bustin, 2000), welche hauptsächlich in der klinischen Diagnostik und der molekularmedizinischen Forschung angewandt wird (Bustin, 2010; He *et al.*, 2008; Kühne & Oschmann, 2002; Lang *et al.*, 2011; Murphy & Bustin, 2009; Scheurer *et al.*, 2007; Shintani-Ishida *et al.*, 2005; Stahlberg *et al.*, 2005; Trombley *et al.*, 2010; Vendittelli *et al.*, 2009; Vijgen *et al.*, 2005). Die Untersuchung der Genexpression von Bakterien mittels dieser Methodik wurde bisher nur vereinzelt beschrieben. Jene Studien beschäftigten sich mit der Detektion von Pathogenen (Eleaume & Jabbouri, 2004; Sohni *et al.*, 2008), der Qualitätssicherung von Futtermitteln (Jørgensen & Leser, 2007) und der

Analyse von Umweltproben (Bach *et al.*, 2002; Galluzzi *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005; Perini *et al.*, 2011; Smith & Osborn, 2009).

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines präzisen Messsystems für die reproduzierbare Quantifizierung intrazellulärer Transkriptmengen basierend auf der RT-qPCR, um die Transkriptbildungsraten für katabole Gene in *B. subtilis* zu ermitteln. Hierzu wurde ein One-Step-System in Kombination mit einer Plasmid-basierten Standardkurve für die Bestimmung der Menge spezifischer mRNA in einer Probe etabliert. Die Entwicklung der Messsysteme für *xylA* (Abb. 4.4) und *xynP* (Tab. 4.2, 4.3) zeigt die Notwendigkeit der Optimierung der genspezifischen Oligonukleotide für die Reverse Transkription (Lekanne Deprez *et al.*, 2002) und der anschließenden qPCR sowie der Annealingtemperaturen. Somit wird eine hohe Spezifität, Sensitivität und Effizienz der PCR-Reaktion (Abb. 4.5, 4.6) und damit der Quantifizierung gewährleistet (Bustin *et al.*, 2009; Bustin *et al.*, 2010). Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte absolute Quantifizierung basiert auf der Verwendung eines externen Standardplasmids, auf dem jeweils das 3‘-Ende des Zielgens kodiert ist. DNA-basierte Standardkurven ermöglichen eine stabile Quantifizierung über einen großen linearen Detektionsbereich (Bustin, 2000; Eleaume & Jabbouri, 2004; Johnston *et al.*, 2010; Schmittgen *et al.*, 2008; Yun *et al.*, 2006). Die Plasmid-basierte Standardkurve liefert dabei eine höhere Reproduzierbarkeit der Quantifizierung (Dhanasekaran *et al.*, 2010; Pfaffl & Hageleit, 2001). Der Detektionsbereich der in dieser Studie eingesetzten Standardkurven wurde so gewählt, dass sowohl an der oberen als auch unteren Detektionsgrenze ein jeweils um den Faktor 10^3 bis 10^4 höheres bzw. niedrigeres Signal detektiert wird als die analysierten biologischen Proben. So wurde sichergestellt, dass der Analyse der Proben eine lineare Abhängigkeit zwischen dem C_q-Wert und der bestimmten Anzahl der Transkriptmoleküle zugrunde liegt.

5.2 Zeitaufgelöste quantitative Analyse der Transkription von *xylA* und *xynP*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die intrazellulären Transkriptlevel von *xylA* (Xylose-Isomerase) und *xynP* (Xylosidtransporter) unter Einfluss des Übergangs zu Glukosehunger quantifiziert. Hierbei wurden in *B. subtilis* WH1118 für *xylA* Transkriptkonzentrationen zwischen $4*10^{-9}$ und $1,6*10^{-8}$ mol mRNA pro Liter Zytoplasma ermittelt. Die Quantifizierung der *xynP*-mRNA in *B. subtilis* WH1117 ergab eine intrazelluläre mRNA-Konzentration von $1*10^{-11}$ bis $3,4*10^{-9}$ mol mRNA pro Liter Zytoplasma. In *E. coli* (Schuhmacher *et al.*, 2010) und Hefe (Monje-Casas *et al.*, 2004) wurden intrazellulären Transkriptmengen gleicher Größenordnung nachgewiesen. Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen zählen *xylA* und *xynP* wahrscheinlich zu den niedrigkonzentrierten Transkripten in *B. subtilis*, da unter vergleichbaren Wuchsbedingungen in der Stationärphase eine um Faktor 5 bis 50 höhrere Transkriptmenge von *acoA* (kodiert für die Untereinheit der Acetoin-Dehydrogenase) detektiert wurde (Jürgen *et al.*, 2005).

Die zeitaufgelöste Analyse der *xylA*-Expression wurde beim Übergang von exponentiellem glukoseabhängigem Wachstum zu Glukosehunger durchgeführt. Der gleichbleibende Transkriptlevel während der exponentiellen Phase des Zellwachstums resultiert aus der Bindung des CcpA-HPrSer46P-Komplexes an die *cre*, wodurch die Expression von *xylA* blockiert wird (Gärtner *et al.*, 1988; Kraus *et al.*, 1994). Bei dem Übergang in die Stationärphase, welcher mit dem vollständigen Verbrauch der Glukose im Medium gleichzusetzen ist (Fischer, 2008), kommt es zum etwa dreifachen Anstieg des mRNA-Levels in der Zelle (Abb. 4.9) bzw. zu einem anderthalbfachen Anstieg der β-Galaktosidase-Aktivität (Abb. 4.11). Dieser Anstieg der Transkriptkonzentration spiegelt somit auf mRNA-Ebene die Aufhebung der KKR in Abwesenheit der Glukose wider. Bisherige Studien der Expression von *xylA-lacZ*-Fusionen in Anwesenheit von Glukose im Δ*xylR*-Stamm zeigten eine etwa zehnfach höhere Basalexpression im

Vergleich zum Wildtypstamm. Daraus resultiert eine schwächere Glukoserepression von Faktor vier im *xylR*-Deletionsstamm (Kraus *et al.*, 1994). Dieser Effekt der erhöhten Expression von *xylA* im Δ*xylR*-Stamm in Anwesenheit von Glukose (Abb. 4.11) resultiert aus einem Antiinduktionseffekt von Glukose-6-P (Glk-6-P) auf den Xyl-Repressor (Dahl *et al.*, 1995). Dieser basiert auf der Bildung eines Glk-6-P-XylR-Komplexes. Der Komplex kann entweder Xylose nicht mehr binden oder die Interaktion mit Xylose kann keine Konformationsänderung des XylR zum Loslösen vom *xyl*-Operator mehr induzieren. Der Einfluss der Glukose-abhängigen Repression über die Anti-Induktion von XylR wurde ebenfalls in *B. megaterium* (Rygus & Hillen, 1992) und *B. licheniformis* (Scheler & Hillen, 1993) nachgewiesen.

Die *xynP*-Expression wurde zeitaufgelöst im Übergang von exponentiellem Wachstum auf Glukose zu Glukosehunger analysiert. Solange *B. subtilis* die zur Verfügung stehende Glukose verstoffwechselt, wird die Transkription von *xynP* durch die Bindung des aktivierten CcpA-Komplexes an die *cre* reprimiert (Galinier *et al.*, 1999). Nach vollständiger Verstoffwechslung der Glukose und dem dadurch ausgelösten Übergang in die Stationärphase (Fischer, 2008) steigt die intrazelluläre Transkript-konzentration sofort an und erhöht sich bis zur fortgeschrittenen Stationärphase um den Faktor 35 (Abb. 4.10). Durch die rapide Auflösung der Bindung von HPrSer46P an CcpA (Seidel *et al.*, 2005) erfolgt eine schnelle Ablösung von der DNA und damit die unmittelbare Freigabe der Transkription. Die qualitative Analyse mittels RNA-Hybridisierung bestätigt den Trend der intrazellulären Transkriptkonzentration (Abb. 4.15). Die β-Galaktosidase-Aktivitätsmessungen zeigen ein vergleichbares Expressionsmuster. Hierbei kommt es 60 min nach Eintritt in die Stationärphase zu einem etwa 40-fachen Anstieg der Expression (Abb. 4.12). Diese Verzögerung der Reaktion auf die Aufhebung der CcpA-vermittelten Repression wird durch die Zeitdauer der Translation verursacht (Hahne *et al.*, 2010; Le & Schumann, 2008). Der bereits bei *xylA* erläuterte Effekt der Anti-Induktion von XylR durch Glk-6-P führt bei Deletion von XylR zu einer etwa fünffach schwächeren Repression von *xynP* in Gegenwart von Glukose

(Singh *et al.*, 2008) (Abb. 4.12). Die Expression von *xynP* wird in einem *xylR*-Deletionsstamm durch CcpA allein stärker reprimiert als *xylA* (Abb. 4.9, 4.11). Dies zeigen auch quantitative Interaktionsstudien, bei der der CcpA-HPrSer46P-Komplex im Vergleich zur *xylA-cre* eine etwa 14-fach stärkere Affinität zur *xynP-cre* zeigt (Maike Bartholomae, persönliche Mitteilung).

5.3 Raten des Transkriptauf- und abbaus von *xylA* und *xynP* in *B. subtilis*

Die Entwicklung und Etablierung einer Methode zur Quantifizierung intrazellulärer Transkriptkonzentrationen bildet auch die Grundlage für die Bestimmung der Transkriptbildungsrate in *B. subtilis*. Dies ist ein wichtiger Parameter für die Modellierung der KKR im Rahmen eines system-biologischen Ansatzes. Jegliche Analyse der mRNA-Menge detektiert stets die Differenz aus Transkriptauf- und abbau, hier bezeichnet als Transkript-akkumulierung. Die Berechnung der Transkriptionsrate erfordert demzufolge neben der Bestimmung der Akkumulierung auch die Analyse der Abbaurate der mRNA.

Die Akkumulierung der mRNA ist die Änderung der intrazellulären Transkriptkonzentration, die mittels der RT-qPCR gemessen wird, und kann daher aus dem Anstieg der Transkriptmenge pro Zelle nach der Aufhebung der KKR ermittelt werden. Hierbei entsteht eine dreifach höhere Menge an *xylA*-mRNA im Vergleich zu *xynP*-mRNA (siehe 4.10).

Die Halbwertszeit der beiden in dieser Arbeit untersuchten Transkripte ergab für die *xylA*-mRNA 5 min und für das *xynP*-Transkript 2,1 min. Damit liegen beide Werte im Bereich der bisherigen genomumfassenden Analysen mittels Microarray-Technologie sowie RNA-Hybridisierungsexperimenten (Bernstein *et al.*, 2002; Hambraeus *et al.*, 2003; Redon *et al.*, 2005). Das *xynP*-Transkript zeigt einen etwa zweifach schnelleren Abbau der mRNA (siehe 4.10).

Aus den beiden bestimmten Parametern kann nun die Transkriptionsrate berechnet werden (siehe 4.10). Pro Stunde und KbE werden im Vergleich zu *xylA* etwa doppelt soviele *xynP*-Transkripte gebildet. Im Falle beider Gene wird die mRNA mit jeweils nahezu gleicher Geschwindigkeit transkribiert und wieder abgebaut, so dass eine schnelle Anpassung der Transkript-verfügbarkeit an die präsente Kohlenstoffquelle erfolgt. Im Vergleich beider Gene wird das Transkript von *xylA* langsamer synthetisiert, ist jedoch stabiler und akkumuliert stärker in der Zelle. Die mRNA von *xynP* wird schneller auf- und abgebaut und akkumuliert in kürzerer Zeit, was in einer flexibleren Verfügbarkeit des Transkripts resultiert. Bedingt durch diese hohe Flexibilität der Transkriptverfügbarkeit kommt es nur zu einer schwachen Akkumulierung der mRNA-Moleküle in der Zelle. Dennoch ist die Transkriptkonzentration hoch genug, um bei einer Translationsrate in Minimalmedium von zehn Aminosäuren pro Sekunde (Siller *et al.*, 2010) eine effiziente Proteinsynthese zu ermöglichen.

Die Transkriptstabilität und damit die Abbaurate zeigen sowohl in Gram-positiven (Barnett *et al.*, 2007; Condon & Bechhofer, 2011) als auch in Gram-negativen (Nilsson *et al.*, 1984) Bakterien eine Abhängigkeit von der Wuchsphase bzw. von der Wuchsrate. Die Transkriptionsrate ist durch die Verfügbarkeit der RNA-Polymerase ebenfalls abhängig von der Wuchsrate (Bremer & Dennis, 1996; Liang *et al.*, 1999). Durch die Abhängigkeit der Kinetik der Transkription und des mRNA-Abbaus von der Wuchsrate ist die Vergleichbarkeit der Daten nur in begrenztem Maße möglich. Die Optimierung der Wuchsbedingungen im Rahmen dieser Arbeit resultierte in einer konstanten, maximalen Wuchsrate in Minimalmedium ohne Zugabe von Aminosäuren (siehe Punkt 4.1, 4.2). Dies ermöglicht die vergleichende Betrachtung der Geschwindigkeit des Transkriptauf- und abbaus von *xylA* und *xynP* bei den hier definierten Wuchsbedingungen.

5.4 Regulation der *alsS*-Expression in KKR-defizienten *B. subtilis*-Stämmen

Die *alsS*-Expression wird indirekt positiv von CcpA beeinflusst, da stromaufwärts des Promotors des *alsSD*-Operons keine *cre*-Sequenz liegt, *ccpA*-Deletionsmutanten jedoch keine Aktivierung der Transkription zeigen (Horstmann, 2006; Lulko *et al.*, 2007; Schlottmann, 2009; Sprehe, 2007; Turinsky *et al.*, 2000).

Von Ludwig *et al.* (2002) wurde ein Regulationsmechanismus beschrieben, welcher auf der Modulierung der PTS-abhängigen Zuckeraufnahme durch CcpA basiert und im Folgenden erläutert wird. In einer Δ*ccpA*-Mutante liegt HPr durch eine erhöhte Kinase-Aktivität der HPr-Kinase/Phosphorylase fast ausschließlich als HPrSer46P oder in geringen Mengen doppelt phosphoryliert als HPrSer46PHis15P vor (Ludwig *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung von HPrSer46P zusätzlich am Histidin 15 erfolgt nur in sehr geringem Maße (Deutscher *et al.*, 1984). Doppelt phosphoryliertes HPr liegt in kleinen Mengen auch im Wildtyp vor, kann das Enzym II des PTS jedoch nicht phosphorylieren (Reizer *et al.*, 1989). Da die Funktion von HPr als Phosphotransporter im PTS-System an die His15-Phosphorylierung gekoppelt ist, hemmt die *ccpA*-Deletion durch den Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus des HPr die Aufnahme PTS-abhängiger Kohlenstoffquellen. Dies kann zu einem Mangel an Induktor- oder Repressorsubstanz und damit zur Deregulation führen (Ludwig *et al.*, 2002). Dieser Effekt in einer CcpA-Deletionsmutante kann durch eine *ptsH*I - Mutation (HPrSer46Ala) ausgeglichen werden. Diese kann nicht an der Position 46 phosphoryliert werden, ist jedoch am Histidin 15 phosphorylierbar und stellt so die Verfügbarkeit von HPrHis15P im PTS sicher. Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob dieser Effekt der *ccpA*-Deletion einen Einfluss auf die Regulation von *alsS* hat. Die *alsS*-Expression zeigte jedoch keine Abhängigkeit der Genexpression von PTS- oder Nicht-PTS-Kohlenstoffquellen in KKR-defizienten Stämmen (Abb. 4.18). Das Expressionsniveau in der Δ*ccpA*-*ptsH*I-Doppelmutante war im Vergleich zu

der ∆*ccpA*- bzw. der *ptsH*I-Mutante etwa um den Faktor 20 erhöht, konnte das Niveau des Wildtyps jedoch nicht erreichen (Abb. 4.18). Damit hat der Aufnahmeweg der Kohlenstoffquelle keinen Einfluss auf die *alsS*-Aktivierung, während die mangelnde Versorgung mit HPrHis15P in der ∆*ccpA*-Mutante einen begrenzten Einfluss auf die Expression von *alsS* zeigte. Die Aufnahme des Zuckers über das PTS hat offenbar einen eingeschränkten Einfluss auf die *alsS*-Regulation

Im Wildtypstamm konnte eine klare Hierarchie der Stärke der Aktivierung der *alsS*-Expression in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle beobachtet werden (Abb. 4.18). Die Rangfolge Glukose – Fruktose – Mannitol – Glycerin – Mannose – Sorbit – Glukonat – Arabinose ist bereits für die KKR des *xynPB*-Operons beschrieben (Singh *et al.*, 2008). Die Deletion essentieller Komponenten der KKR, CcpA und HPrSer46P, führte stets zum Zusammenbruch dieser klaren Hierarchie (Abb. 4.18). Die leichte Aktivierung in der ∆*ccpA*-*ptsH*I-Doppelmutante scheint unabhängig von der Art des Zuckeraufnahmesystems zu sein. Als Ursache für diese Hierarchie im Wildtypstamm wird die Wirkung der jeweiligen Kohlenstoffquelle auf die Aktivität der HPr-Kinase/Phosphorylase und damit den HPrSer46P-Spiegel der Zelle beschrieben (Singh *et al.*, 2008). Da HPrSer46P direkt in der KKR involviert ist, wird die Stärke der KKR durch die präsente Kohlenstoffquelle reguliert. Da dieser Effekt auch für *alsS* beobachtet wurde, weist dies auf einen Regulationsmechanismus hin, bei dem der CcpA-HPrSer46P mit einer *cre*-Sequenz interagiert. Diese These wird gestützt durch die Deregulation von *alsS* in *ccpA*-Punktmutanten, in denen die Bindung des Koeffektors bzw. die Bindung des Komplexes an die DNA verhindert wird (Horstmann, 2006; Sprehe, 2003; Sprehe, 2007).

Nachfolgend sollen nun die möglichen CcpA-abhängigen Regulations-mechanismen für die *alsS*-Expression diskutiert werden.

Möglichkeit 1: die direkte Aktivierung der *alsS*-Expression durch CcpA-HPrSer46P-*cre*-Interaktion. Bisherige Studien haben keine aktivierende *alsS*-*cre* stromaufwärts des Promotors beschrieben (Lorca *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2001; Renna *et al.*, 1993). Deutscher *et al.* (2002) hat im untranslatierten

Bereich des *alsS*-Gens eine stark degenerierte *cre*-Sequenz postuliert, deren Funktionalität bisher nicht bestätigt wurde.

Möglichkeit 2: die direkte Aktivierung der Expression des *alsSD*-Aktivators AlsR durch CcpA-HPrSer46P-*cre*-Interaktion. Auch für *alsR* ist keine aktivierende *cre* bekannt (Renna *et al.*, 1993).

Möglichkeit 3: die CcpA-abhängige Synthese eines Induktors für die *alsS*-Expression. Der Induktor für den Transkriptionsaktivator AlsR ist bisher nicht zweifelsfrei identifiziert worden. In der Literatur wird die stimulierende Wirkung des vorherrschenden Überflussmetaboliten Acetat auf AlsR diskutiert (Holtzclaw & Chapman, 1975; Renna *et al.*, 1993). Die Bildung von Acetat ist positiv durch CcpA reguliert (Henkin, 1996; Moir-Blais *et al.*, 2001; Presecan-Siedel *et al.*, 1999). Eine defekte KKR führt zum Mangel der putativen Induktorsubstanz und damit zur fehlenden Aktivierung von *alsS*. Die Zugabe von Acetat konnte diese *alsS*-Deregulierung in KKR-defizienten *B. subtilis*-Stämmen jedoch nicht beseitigen (Turinsky *et al.*, 2000).

Möglichkeit 4: ein indirekter Einfluss von CcpA auf einen weiteren Regulator des *alsSD*-Operons. Dieses wird zusätzlich zu AlsR von dem Redoxrepressor Rex reprimiert. Rex reguliert seine Zielgene in Abhängigkeit des Verhältnisses NADH zu NAD (NADH/NAD) in der Zelle. Ist der NADH-Spiegel in der Zelle niedrig, so reprimiert Rex die Transkription u.a. von *alsS* (Larsson *et al.*, 2005; Reents *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Das Verhältnis NADH/NAD wird von der Terminalen Cytochrom caa_3 Oxidase (*ctaBCDEF*) beeinflusst, deren Expression durch CcpA reprimiert wird (Blencke *et al.*, 2003; Liu & Taber, 1998; Moreno *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2001). Wird nun die KKR durch Mutation von CcpA oder HPrSer46P außer Kraft gesetzt, so begünstigt der erhöhte intrazelluläre Level dieser Oxidase die Reoxidierung von NADH. Daraufhin sinkt das Verhältnis NADH/NAD ab und aktiviert Rex, der die Transkription der Zielgene reprimiert. Dieser indirekte Effekt wurde bereits für das *cydABCD*-Operon (kodiert für Cytochrom *bd* Ubiquinon Oxidase) diskutiert (Larsson *et al.*, 2005), welches in Δ*ccpA*-Mutanten ein zu *alsS* vergleichbares Expressionsmuster zeigte (Moreno *et al.*, 2001). Desweiteren ist für das *cydABCD*-Operon, ähnlich zu *alsS* (Deutscher *et al.*,

2002), eine stark degenerierte *cre*-Sequenz beschrieben, welche die Expression aufgrund der Position zum Transkriptionsstart reprimiert (Puri-Taneja *et al.*, 2007). Die fehlende Aktivierung von *alsS* in KKR-defizienten Mutanten könnte also durch die Deregulierung des NADH/NAD-Verhältnisses und der damit einhergehenden Rex-vermittelten Repression erklärt werden (Abb. 5.1).

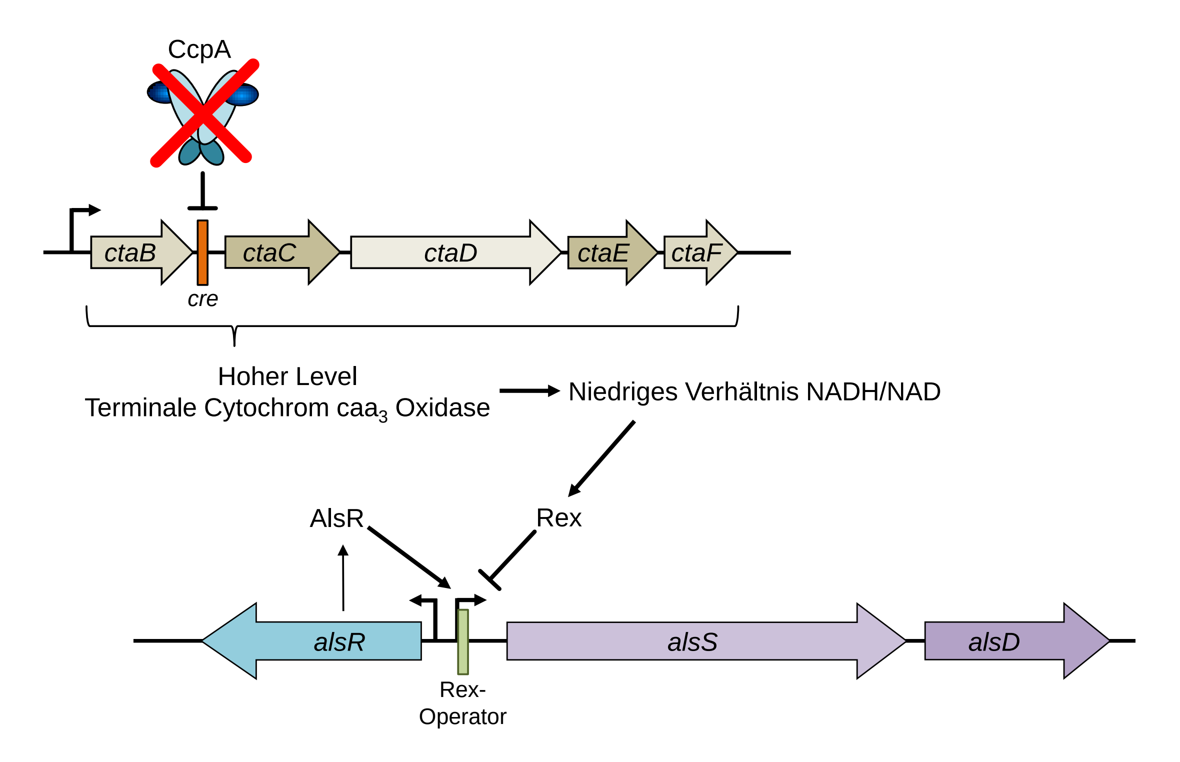


Abb. 5.3: Indirekter Einfluss der CcpA-abhängigen Regulation auf die *alsS*-Expression. In KKR-defizienten Stämmen kommt es aufgrund der fehlenden Repression zu einem erhöhten Level an Cytochrom caa$_3$ Oxidase, die das Verhältnis NADH zu NAD absenkt. Ein niedriger NADH-Spiegel in der Zelle aktiviert den Redoxrepressor Rex, welcher das *alsSD*-Operon reprimiert.

Im Vergleich zu den Δ*ccpA*- und *ptsH*I-Einzelmutanten zeigte *alsS* in der Δ*ccpA*-*ptsH*I-Doppelmutante eine erhöhte Expression. Die Ursache für diesen Effekt konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Die sehr schwache Expression von *alsS* unter aeroben Wuchsbedingungen lässt allerdings darauf schließen, dass dieser Effekt eine untergeordnete Rolle spielt. Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Hauptaufgabe der Produkte des *alsSD*-Operons die Acetoinproduktion bei mikroaeroben

und anaeroben Umweltbedingungen ist (Reents *et al.*, 2006; Schilling *et al.*, 2007; Speck & Freese, 1973).

5.5 Ausblick

Die zeitaufgelöste Bestimmung intrazellulärer mRNA-Mengen ermöglicht im Rahmen dieser Arbeit die Bestimmung von Geschwindigkeiten des Transkriptauf- und abbaus von KKR-regulierten Genen in *B. subtilis*. Damit ist die Voraussetzung geschaffen, diese Raten mit kinetischen und thermodynamischen Kenngrößen der Interaktion von Biomolekülen der KKR zu vernetzen. Darauf aufbauend soll ein dynamisches Computermodell des CcpA-Regulons entwickelt werden, welches das Verständnis dieser komplexen Regulation in *B. subtilis* weiter vertiefen kann.

Das etablierte System ermöglicht die Quantifizierung intrazellulärer Transkriptkonzentrationen unabhängig von der Verfügbarkeit eines internen Referenzgens. Es erlaubt daher die absolute quantitative Analyse der Transkription bei Übergängen zu weiteren physiologische Stressbedingungen, wie z.B. Osmostress oder Hitze- bzw. Kältestress.

Der hier diskutierte indirekte Einfluss der CcpA-vermittelten Regulation auf die *alsS*-Expression sollte durch weiterführende Expressionsstudien von Rex-defizienten *B. subtilis*-Stämmen unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen validiert werden.

6 Literaturverzeichnis

Alcaraz, L. D., Moreno-Hagelsieb, G., Eguiarte, L. E., Souza, V., Herrera-Estrella, L. & Olmedo, G. (2010). Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics* **11**, 332.

Arantes, O. & Lereclus, D. (1991). Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* **108**, 115-119.

Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* **5**, 209-219.

Asrat, S. (2008). Regulation in *Bacillus subtilis* unter Glukosemangel. *Naturwissenschaftliche Fakultät*, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Erlangen, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Aung-Hilbrich, L. M., Seidel, G., Wagner, A. & Hillen, W. (2002). Quantification of the influence of HPrSer46P on CcpA-*cre* interaction. *J Mol Biol* **319**, 77-85.

Bach, H. J., Tomanova, J., Schloter, M. & Munch, J. C. (2002). Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *J Microbiol Methods* **49**, 235-245.

Bakker, B. M., van Eunen, K., Jeneson, J. A., van Riel, N. A., Bruggeman, F. J. & Teusink, B. (2010). Systems biology from micro-organisms to human metabolic diseases: the role of detailed kinetic models. *Biochem Soc Trans* **38**, 1294-1301.

Balkwill, D. L., Reeves, R. H., Drake, G. R., Reeves, J. Y., Crocker, F. H., King, M. B. & Boone, D. R. (1997). Phylogenetic characterization of bacteria in the subsurface microbial culture collection. *FEMS Microbiol Rev* **20**, 201-216.

Barnett, T. C., Bugrysheva, J. V. & Scott, J. R. (2007). Role of mRNA stability in growth phase regulation of gene expression in the group A *streptococcus*. *J Bacteriol* **189**, 1866-1873.

Bernstein, J. A., Khodursky, A. B., Lin, P. H., Lin-Chao, S. & Cohen, S. N. (2002). Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9697-9702.

Blencke, H. M., Homuth, G., Ludwig, H., Mäder, U., Hecker, M. & Stülke, J. (2003). Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metab Eng* **5**, 133-149.

Booth, I. R. (2007). SysMO: back to the future. *Nat Rev Microbiol* **5**, 566.

Botteldoorn, N., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Werbrouck, H., Haesebrouck, F., Donné, E., D'Haese, E., Heyndrickx, M., Pasmans, F. Herman, L. (2006). Real-time reverse transcription PCR for the quantification of the *mnt*H expression of *Salmonella enterica* as a function of growth phase and phagosome-like conditions. *J Microbiol Methods* **66**, 125-135.

Bremer, H. & Dennis, P. P. (1996). Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. In *Escherichia coli and Salmonella*, pp. 1553-1569. Edited by F. C. Neidhardt. Washington, DC: ASM Press.

Brückner, R. & Titgemeyer, F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol Lett* **209**, 141-148.

Buh Gasparic, M., Tengs, T., La Paz, J. L., Holst-Jensen, A., Pla, M., Esteve, T., Zel, J. & Gruden, K. (2010). Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Anal Bioanal Chem* **396**, 2023-2029.

Bumann, D. (2009). System-level analysis of *Salmonella* metabolism during infection. *Curr Opin Microbiol* **12**, 559-567.

Burgess-Herbert, S. L. & Euling, S. Y. (2011). Use of comparative genomic approaches to characterize interspecies differences in response to environmental chemicals: Challenges, opportunities, and research needs. *Toxicol Appl Pharmacol*.

Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**, 169-193.

Bustin, S. A. & Nolan, T. (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* **15**, 155-166.

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **55**, 611-622.

Bustin, S. A. (2010). Developments in real-time PCR research and molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* **10**, 713-715.

Bustin, S. A., Beaulieu, J. F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F. S., Olsvik, P. A., Penning, L. C. & Toegel, S. (2010). MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol* **11**, 74.

Chandler, D. P., Wagnon, C. A. & Bolton, H., Jr. (1998). Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR. *Appl Environ Microbiol* **64**, 669-677.

Chini, V., Foka, A., Dimitracopoulos, G. & Spiliopoulou, I. (2007). Absolute and relative real-time PCR in the quantification of *tst* gene expression among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: evaluation by two mathematical models. *Lett Appl Microbiol* **45**, 479-484.

Condon, C. & Bechhofer, D. H. (2011). Regulated RNA stability in the Gram positives. *Curr Opin Microbiol* **14**, 148-154.

Dahl, M. K., Schmiedel, D. & Hillen, W. (1995). Glucose and glucose-6-phosphate interaction with Xyl repressor proteins from *Bacillus* spp. may contribute to regulation of xylose utilization. *J Bacteriol* **177**, 5467-5472.

de Lorenzo, V. (2008). Systems biology approaches to bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* **19**, 579-589.

Deutscher, J., Kessler, U., Alpert, C. A. & Hengstenberg, W. (1984). Bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: P-Ser-HPr and its possible regulatory function? *Biochemistry* **23**, 4455-4460.

Deutscher, J., Galinier, A. & Martin-Verstraete, I. (2002). *Bacillus subtilis* and its Closest Relatives: from Genes to Cells, pp. 129-150. Edited by A. L. Sonenshein, J. A. Hoch & R. Losick. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.

Deutscher, J., Francke, C. & Postma, P. W. (2006). How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 939-1031.

Deutscher, J. (2008). The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **11**, 87-93.

Dhanasekaran, S., Doherty, T. M. & Kenneth, J. (2010). Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *J Immunol Methods* **354**, 34-39.

Driks, A. (2002). Overview: Development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cell Mol Life Sci* **59**, 389-391.

Eleaume, H. & Jabbouri, S. (2004). Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during *in vitro* growth. *J Microbiol Methods* **59**, 363-370.

Favier, A., Brutscher, B., Blackledge, M., Galinier, A., Deutscher, J., Penin, F. & Marion, D. (2002). Solution structure and dynamics of Crh, the *Bacillus subtilis* catabolite repression HPr. *J Mol Biol* **317**, 131-144.

Fischer, N. (2008). Response of *Bacillus subtilis* to glucose starvation. *Department of biology, chair of microbiology*. Erlangen, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg

Fujita, Y. (2009). Carbon Catabolite Control of the Metabolic Network in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 245-259.

Galinier, A., Kravanja, M., Engelmann, R., Hengstenberg, W., Kilhoffer, M. C., Deutscher, J. & Haiech, J. (1998). New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1823-1828.

Galinier, A., Deutscher, J. & Martin-Verstraete, I. (1999). Phosphorylation of either Crh or HPr mediates binding of CcpA to the *Bacillus subtilis xyn cre* and catabolite repression of the *xyn* operon. *J Mol Biol* **286**, 307-314.

Galluzzi, L., Penna, A., Bertozzini, E., Vila, M., Garces, E. & Magnani, M. (2004). Development of a real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Alexandrium minutum* (a Dinoflagellate). *Appl Environ Microbiol* **70**, 1199-1206.

Gärtner, D., Geissendorfer, M. & Hillen, W. (1988). Expression of the *Bacillus subtilis xyl* operon is repressed at the level of transcription and is induced by xylose. *J Bacteriol* **170**, 3102-3109.

Gärtner, D., Degenkolb, J., Ripperger, J. A., Allmansberger, R. & Hillen, W. (1992). Regulation of the *Bacillus subtilis* W23 xylose utilization operon: interaction of the Xyl repressor with the *xyl* operator and the inducer xylose. *Mol Gen Genet* **232**, 415-422.

Görke, B. & Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* **6**, 613-624.

Gunnewijk, M. G., van den Bogaard, P. T., Veenhoff, L. M., Heuberger, E. H., de Vos, W. M., Kleerebezem, M., Kuipers, O. P. & Poolman, B. (2001). Hierarchical control versus autoregulation of carbohydrate utilization in bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**, 401-413.

Hahne, H., Mäder, U., Otto, A., Bonn, F., Steil, L., Bremer, E., Hecker, M. & Becher, D. (2010). A comprehensive proteomics and transcriptomics analysis of *Bacillus subtilis* salt stress adaptation. *J Bacteriol* **192**, 870-882.

Hambraeus, G., von Wachenfeldt, C. & Hederstedt, L. (2003). Genome-wide survey of mRNA half-lives in *Bacillus subtilis* identifies extremely stable mRNAs. *Mol Genet Genomics* **269**, 706-714.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.

He, J. Y., Cheng, H. J., Wang, Y. F., Zhu, Y. T. & Li, G. Q. (2008). Development of a real-time quantitative reverse transcriptase PCR assay for detection of the Friend leukemia virus load in murine plasma. *J Virol Methods* **147**, 345-350.

Henkin, T. M. (1996). The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **135**, 9-15.

Holtzclaw, W. D. & Chapman, L. F. (1975). Degradative acetolactate synthase of *Bacillus subtilis*: purification and properties. *J Bacteriol* **121**, 917-922.

Horstmann, N. (2006). Influence of various coeffectors on differential carbon catabolite regulation exerted by CcpA. *Naturwissenschaftliche Fakultät*, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Erlangen, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Hueck, C. J., Hillen, W. & Saier, M. H., Jr. (1994). Analysis of a *cis*-active sequence mediating catabolite repression in gram-positive bacteria. *Res Microbiol* **145**, 503-518.

Hueck, C. J. & Hillen, W. (1995). Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the gram-positive bacteria? *Mol Microbiol* **15**, 395-401.

Jacob, S., Allmansberger, R., Gärtner, D. & Hillen, W. (1991). Catabolite repression of the operon for xylose utilization from *Bacillus subtilis* W23 is mediated at the level of transcription and depends on a *cis* site in the *xylA* reading frame. *Mol Gen Genet* **229**, 189-196.

Jault, J. M., Fieulaine, S., Nessler, S., Gonzalo, P., Di Pietro, A., Deutscher, J. & Galinier, A. (2000). The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive cooperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J Biol Chem* **275**, 1773-1780.

Johnson, D. R., Lee, P. K., Holmes, V. F. & Alvarez-Cohen, L. (2005). An internal reference technique for accurately quantifying specific mRNAs by real-time PCR with application to the *tceA* reductive dehalogenase gene. *Appl Environ Microbiol* **71**, 3866-3871.

Johnston, C., Ufnar, J. A., Griffith, J. F., Gooch, J. A. & Stewart, J. R. (2010). A real-time qPCR assay for the detection of the *nifH* gene of *Methanobrevibacter smithii*, a potential indicator of sewage pollution. *J Appl Microbiol* **109**, 1946-1956.

Jørgensen, C. & Leser, T. D. (2007). Estimating amplification efficiency improves multiplex real-time PCR quantification of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores in animal feed. *J Microbiol Methods* **68**, 588-595.

Jürgen, B., Barken, K. B., Tobisch, S., Pioch, D., Wumpelmann, M., Hecker, M. & Schweder, T. (2005). Application of an electric DNA-chip for the expression analysis of bioprocess-relevant marker genes of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* **92**, 299-307.

Kim, J. H., Yang, Y. K. & Chambliss, G. H. (2005). Evidence that *Bacillus* catabolite control protein CcpA interacts with RNA polymerase to inhibit transcription. *Mol Microbiol* **56**, 155-162.

Kitano, H. (2002). Systems biology: a brief overview. *Science* **295**, 1662-1664.

Kleerebezem, M. (2004). Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides* **25**, 1405-1414.

Kleerebezem, M., Bongers, R., Rutten, G., de Vos, W. M. & Kuipers, O. P. (2004). Autoregulation of subtilin biosynthesis in *Bacillus subtilis*: the role of the *spa*-box in subtilin-responsive promoters. *Peptides* **25**, 1415-1424.

Kraus, A. (1993). Einfluss einer *cis*-aktiven Sequenz und des Xyl-Repressors auf die Glucoserepression des *xyl*-Operons von *Bacillus subtilis* W23. *Naturwissenschaftliche Fakultät*, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Erlangen, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.

Kraus, A., Hueck, C., Gärtner, D. & Hillen, W. (1994). Catabolite repression of the *Bacillus subtilis xyl* operon involves a *cis* element functional in the context of an unrelated sequence, and glucose exerts additional xylR-dependent repression. *J Bacteriol* **176**, 1738-1745.

Kühne, B. S. & Oschmann, P. (2002). Quantitative real-time RT-PCR using hybridization probes and imported standard curves for cytokine gene expression analysis. *Biotechniques* **33**, 1078, 1080-1072, 1084 passim.

Lang, P. O., Mitchell, W. A., Govind, S. & Aspinall, R. (2011). Real time-PCR assay estimating the naive T-cell pool in whole blood and dried blood spot samples: pilot study in young adults. *J Immunol Methods* **369**, 133-140.

Larsson, J. T., Rogstam, A. & von Wachenfeldt, C. (2005). Coordinated patterns of cytochrome bd and lactate dehydrogenase expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **151**, 3323-3335.

Lavergne, J. P., Jault, J. M. & Galinier, A. (2002). Insights into the functioning of *Bacillus subtilis* HPr kinase/phosphatase: affinity for its protein substrates and role of cations and phosphate. *Biochemistry* **41**, 6218-6225.

Le, A. T. & Schumann, W. (2008). Regulation of the *spoVM* gene of *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* **57**, 484-489.

Lee, H. & Kim, H. Y. (2011). Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. *J Microbiol Biotechnol* **21**, 229-235.

Lekanne Deprez, R. H., Fijnvandraat, A. C., Ruijter, J. M. & Moorman, A. F. (2002). Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal Biochem* **307**, 63-69.

Liang, S., Bipatnath, M., Xu, Y., Chen, S., Dennis, P., Ehrenberg, M. & Bremer, H. (1999). Activities of constitutive promoters in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **292**, 19-37.

Lindner, C., Stülke, J. & Hecker, M. (1994). Regulation of xylanolytic enzymes in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **140 (4)**, 753-757.

Liu, X. & Taber, H. W. (1998). Catabolite regulation of the *Bacillus subtilis ctaBCDEF* gene cluster. *J Bacteriol* **180**, 6154-6163.

Lorca, G. L., Chung, Y. J., Barabote, R. D., Weyler, W., Schilling, C. H. & Saier, M. H., Jr. (2005). Catabolite repression and activation in *Bacillus subtilis*: dependency on CcpA, HPr, and HprK. *J Bacteriol* **187**, 7826-7839.

Losick, R., Youngman, P. & Piggot, P. J. (1986). Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* **20**, 625-669.

Ludwig, H., Rebhan, N., Blencke, H. M., Merzbacher, M. & Stülke, J. (2002). Control of the glycolytic *gapA* operon by the catabolite control protein A in *Bacillus subtilis*: a novel mechanism of CcpA-mediated regulation. *Mol Microbiol* **45**, 543-553.

Lulko, A. T., Buist, G., Kok, J. & Kuipers, O. P. (2007). Transcriptome analysis of temporal regulation of carbon metabolism by CcpA in *Bacillus subtilis* reveals additional target genes. *J Mol Microbiol Biotechnol* **12**, 82-95.

Marco, M. L. & Kleerebezem, M. (2008). Assessment of real-time RT-PCR for quantification of *Lactobacillus plantarum* gene expression during stationary phase and nutrient starvation. *J Appl Microbiol* **104**, 587-594.

Martin-Verstraete, I., Stülke, J., Klier, A. & Rapoport, G. (1995). Two different mechanisms mediate catabolite repression of the *Bacillus subtilis* levanase operon. *J Bacteriol* **177**, 6919-6927.

Mijakovic, I., Poncet, S., Galinier, A., Monedero, V., Fieulaine, S., Janin, J., Nessler, S., Marquez, J.A., Scheffzek, K., Hasenbein, S., Hengstenberg, W., Deutscher, J. (2002). Pyrophosphate-producing protein dephosphorylation by HPr kinase/phosphorylase: a relic of early life? *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13442-13447.

Miwa, Y., Nakata, A., Ogiwara, A., Yamamoto, M. & Fujita, Y. (2000). Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **28**, 1206-1210.

Miwa, Y. & Fujita, Y. (2001). Involvement of two distinct catabolite-responsive elements in catabolite repression of the *Bacillus subtilis* myo-inositol (*iol*) operon. *J Bacteriol* **183**, 5877-5884.

Moir-Blais, T. R., Grundy, F. J. & Henkin, T. M. (2001). Transcriptional activation of the *Bacillus subtilis ackA* promoter requires sequences upstream of the CcpA binding site. *J Bacteriol* **183**, 2389-2393.

Monje-Casas, F., Michan, C. & Pueyo, C. (2004). Absolute transcript levels of thioredoxin- and glutathione-dependent redox systems in *Saccharomyces cerevisiae*: response to stress and modulation with growth. *Biochem J* **383**, 139-147.

Moreno, M. S., Schneider, B. L., Maile, R. R., Weyler, W. & Saier, M. H., Jr. (2001). Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol Microbiol* **39**, 1366-1381.

Murphy, J. & Bustin, S. A. (2009). Reliability of real-time reverse-transcription PCR in clinical diagnostics: gold standard or substandard? *Expert Rev Mol Diagn* **9**, 187-197.

Nessler, S., Fieulaine, S., Poncet, S., Galinier, A., Deutscher, J. & Janin, J. (2003). HPr kinase/phosphorylase, the sensor enzyme of catabolite repression in Gram-positive bacteria: structural aspects of the enzyme and the complex with its protein substrate. *J Bacteriol* **185**, 4003-4010.

Nielsen, K. K. & Boye, M. (2005). Real-time quantitative reverse transcription-PCR analysis of expression stability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* housekeeping genes during *in vitro* growth under iron-depleted conditions. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2949-2954.

Nilsson, G., Belasco, J. G., Cohen, S. N. & von Gabain, A. (1984). Growth-rate dependent regulation of mRNA stability in *Escherichia coli*. *Nature* **312**, 75-77.

Nolan, T., Hands, R. E. & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* **1**, 1559-1582.

Ollinger, J., Song, K. B., Antelmann, H., Hecker, M. & Helmann, J. D. (2006). Role of the Fur regulon in iron transport in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**, 3664-3673.

Peng, X., Chan, E. Y., Li, Y., Diamond, D. L., Korth, M. J. & Katze, M. G. (2009). Virus-host interactions: from systems biology to translational research. *Curr Opin Microbiol* **12**, 432-438.

Perini, F., Casabianca, A., Battocchi, C., Accoroni, S., Totti, C. & Penna, A. (2011). New approach using the real-time PCR method for estimation of the toxic marine dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* in marine environment. *PLoS One* **6**, e17699.

Pfaffl, M. W. & Hageleit, M. (2001). Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters* **23**, 275-282.

Piggot, P. J. & Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* **7**, 579-586.

Poncet, S., Mijakovic, I., Nessler, S., Gueguen-Chaignon, V., Chaptal, V., Galinier, A., Boel, G., Maze, A. & Deutscher, J. (2004). HPr kinase/phosphorylase, a Walker motif A-containing bifunctional sensor enzyme controlling catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1697**, 123-135.

Postma, P. W., Lengeler, J. W. & Jacobson, G. R. (1993). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 543-594.

Presecan-Siedel, E., Galinier, A., Longin, R., Deutscher, J., Danchin, A., Glaser, P. & Martin-Verstraete, I. (1999). Catabolite regulation of the *pta* gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**, 6889-6897.

Priest, F. G. (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol Rev* **41**, 711-753.

Pritchard, L. & Birch, P. (2011). A systems biology perspective on plant-microbe interactions: biochemical and structural targets of pathogen effectors. *Plant Sci* **180**, 584-603.

Puri-Taneja, A., Schau, M., Chen, Y. & Hulett, F. M. (2007). Regulators of the *Bacillus subtilis cydABCD* operon: identification of a negative regulator, CcpA, and a positive regulator, ResD. *J Bacteriol* **189**, 3348-3358.

Redon, E., Loubiere, P. & Cocaign-Bousquet, M. (2005). Role of mRNA stability during genome-wide adaptation of *Lactococcus lactis* to carbon starvation. *J Biol Chem* **280**, 36380-36385.

Reents, H., Münch, R., Dammeyer, T., Jahn, D. & Härtig, E. (2006). The Fnr regulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**, 1103-1112.

Reizer, J., Sutrina, S. L., Saier, M. H., Stewart, G. C., Peterkofsky, A. & Reddy, P. (1989). Mechanistic and physiological consequences of HPr(ser) phosphorylation on the activities of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in gram-positive bacteria: studies with site-specific mutants of HPr. *EMBO J* **8**, 2111-2120.

Reizer, J., Hoischen, C., Titgemeyer, F., Rivolta, C., Rabus, R., Stülke, J., Karamata, D., Saier, M. H., Jr. & Hillen, W. (1998). A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol Microbiol* **27**, 1157-1169.

Reizer, J., Bachem, S., Reizer, A., Arnaud, M., Saier, M. H., Jr. & Stülke, J. (1999). Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis - the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **145 (Pt 12)**, 3419-3429.

Renna, M. C., Najimudin, N., Winik, L. R. & Zahler, S. A. (1993). Regulation of the *Bacillus subtilis alsS*, *alsD*, and *alsR* genes involved in post-exponential-phase production of acetoin. *J Bacteriol* **175**, 3863-3875.

Rygus, T. & Hillen, W. (1992). Catabolite repression of the *xyl* operon in *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol* **174**, 3049-3055.

Saier, M. H., Jr. & Reizer, J. (1992). Proposed uniform nomenclature for the proteins and protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *J Bacteriol* **174**, 1433-1438.

Saier, M. H., Jr. & Reizer, J. (1994). The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. *Mol Microbiol* **13**, 755-764.

Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning-A laboratory manual*. Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.

Savli, H., Karadenizli, A., Kolayli, F., Gundes, S., Ozbek, U. & Vahaboglu, H. (2003). Expression stability of six housekeeping genes: A proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. *J Med Microbiol* **52**, 403-408.

Scheler, A. & Hillen, W. (1993). Glucose is an anti-inducer for the *Bacillus licheniformis* encoded XylR repressor. *FEMS Microbiol Lett* **107**, 299-302.

Scheurer, M. E., Dillon, L. M., Chen, Z., Follen, M. & Adler-Storthz, K. (2007). Absolute quantitative real-time polymerase chain reaction for the measurement of human papillomavirus E7 mRNA in cervical cytobrush specimens. *Infect Agent Cancer* **2**, 8.

Schilling, O., Frick, O., Herzberg, C., Ehrenreich, A., Heinzle, E., Wittmann, C. & Stülke, J. (2007). Transcriptional and metabolic responses of *Bacillus subtilis* to the availability of organic acids: transcription regulation is important but not sufficient to account for metabolic adaptation. *Appl Environ Microbiol* **73**, 499-507.

Schlottmann, I. (2009). Analyse der CcpA-Punktmutanten R54E und R54F in Minimalmedium. *Naturwissenschaftliche Fakultät*, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Erlangen, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.

Schmittgen, T. D., Lee, E. J., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., Elton, T. S. & Chen, C. (2008). Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods* **44**, 31-38.

Schuhmacher, T., Lemuth, K., Hardiman, T., Vacun, G., Reuss, M. & Siemann-Herzberg, M. (2010). Quantifying cytosolic messenger RNA concentrations in *Escherichia coli* using real-time polymerase chain reaction for a systems biology approach. *Anal Biochem* **398**, 212-217.

Schultz, S. J. & Champoux, J. J. (2008). RNase H activity: structure, specificity, and function in reverse transcription. *Virus Res* **134**, 86-103.

Schumacher, M. A., Allen, G. S., Diel, M., Seidel, G., Hillen, W. & Brennan, R. G. (2004). Structural basis for allosteric control of the transcription regulator CcpA by the phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell* **118**, 731-741.

Schumacher, M. A., Seidel, G., Hillen, W. & Brennan, R. G. (2006). Phosphoprotein Crh-Ser46-P displays altered binding to CcpA to effect carbon catabolite regulation. *J Biol Chem* **281**, 6793-6800.

Schumacher, M. A., Seidel, G., Hillen, W. & Brennan, R. G. (2007). Structural mechanism for the fine-tuning of CcpA function by the small molecule effectors glucose 6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate. *J Mol Biol* **368**, 1042-1050.

Seidel, G., Diel, M., Fuchsbauer, N. & Hillen, W. (2005). Quantitative interdependence of coeffectors, CcpA and *cre* in carbon catabolite regulation of *Bacillus subtilis*. *FEBS J* **272**, 2566-2577.

Shintani-Ishida, K., Zhu, B. L. & Maeda, H. (2005). TaqMan fluorogenic detection system to analyze gene transcription in autopsy material. *Methods Mol Biol* **291**, 415-421.

Shivers, R. P. & Sonenshein, A. L. (2005). *Bacillus subtilis ilvB* operon: an intersection of global regulons. *Mol Microbiol* **56**, 1549-1559.

Shivers, R. P., Dineen, S. S. & Sonenshein, A. L. (2006). Positive regulation of *Bacillus subtilis ackA* by CodY and CcpA: establishing a potential hierarchy in carbon flow. *Mol Microbiol* **62**, 811-822.

Siller, E., DeZwaan, D. C., Anderson, J. F., Freeman, B. C. & Barral, J. M. (2010). Slowing bacterial translation speed enhances eukaryotic protein folding efficiency. *J Mol Biol* **396**, 1310-1318.

Singh, K. D., Schmalisch, M. H., Stülke, J. & Görke, B. (2008). Carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*: quantitative analysis of repression exerted by different carbon sources. *J Bacteriol* **190**, 7275-7284.

Smith, C. J. & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* **67**, 6-20.

Sohni, Y., Kanjilal, S. & Kapur, V. (2008). Cloning and development of synthetic internal amplification control for *Bacillus anthracis* real-time polymerase chain reaction assays. *Diagn Microbiol Infect Dis* **61**, 471-475.

Sonenshein, A. L. (2007). Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* **5**, 917-927.

Speck, E. L. & Freese, E. (1973). Control of metabolite secretion in *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* **78**, 261-275.

Spivey, A. (2004). Systems biology: the big picture. *Environ Health Perspect* **112**, A938-943.

Sprehe, M. (2003). *In vivo* Charakterisierung von *ccpA* Allelen in *Bacillus subtilis*. *Naturwissenschaftliche Fakultät*, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Erlangen, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.

Sprehe, M. (2007). Mechanismen der Katabolitenregulation in Bacilli. *Naturwissenschaftliche Fakultät*, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Erlangen, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.

Stahlberg, A., Zoric, N., Aman, P. & Kubista, M. (2005). Quantitative real-time PCR for cancer detection: the lymphoma case. *Expert Rev Mol Diagn* **5**, 221-230.

Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* **56**, 845-857.

Stites, E. C. & Ravichandran, K. S. (2009). A systems perspective of *ras* signaling in cancer. *Clin Cancer Res* **15**, 1510-1513.

Stülke, J., Martin-Verstraete, I., Zagorec, M., Rose, M., Klier, A. & Rapoport, G. (1997). Induction of the *Bacillus subtilis ptsGHI* operon by glucose is controlled by a novel antiterminator, GlcT. *Mol Microbiol* **25**, 65-78.

Stülke, J. & Hillen, W. (1999). Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **2**, 195-201.

Stülke, J. & Hillen, W. (2000). Regulation of carbon catabolism in *Bacillus species*. *Annu Rev Microbiol* **54**, 849-880.

Tan, S. L., Ganji, G., Paeper, B., Proll, S. & Katze, M. G. (2007). Systems biology and the host response to viral infection. *Nat Biotechnol* **25**, 1383-1389.

Tännler, S., Decasper, S. & Sauer, U. (2008). Maintenance metabolism and carbon fluxes in *Bacillus* species. *Microb Cell Fact* **7**, 19.

Tasara, T. & Stephan, R. (2007). Evaluation of housekeeping genes in *Listeria monocytogenes* as potential internal control references for normalizing mRNA expression levels in stress adaptation models using real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett* **269**, 265-272.

Teusink, B., Westerhoff, H. V. & Bruggeman, F. J. (2010). Comparative systems biology: from bacteria to man. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2**, 518-532.

Titgemeyer, F. & Hillen, W. (2002). Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 59-71.

Tobisch, S., Zühlke, D., Bernhardt, J., Stülke, J. & Hecker, M. (1999). Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**, 6996-7004.

Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Deutscher, J., Hirooka, K. & Fujita, Y. (2005). Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis ilv-leu* operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA. *Mol Microbiol* **56**, 1560-1573.

Triggle, D. J. (2007). Drug discovery and delivery in the 21st century. *Med Princ Pract* **16**, 1-14.

Trombley, A. R., Wachter, L., Garrison, J., Buckley-Beason, V.A., Jahrling, J., Hensley, L.E., Schoepp, R.J., Norwood, D.A., Goba, A., Fair, J.N., Kulesh, D.A. (2010). Comprehensive panel of real-time TaqMan polymerase chain reaction assays for detection and absolute quantification of filoviruses, arenaviruses, and New World hantaviruses. *Am J Trop Med Hyg* **82**, 954-960.

Tsuge, K., Akiyama, T. & Shoda, M. (2001). Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *J Bacteriol* **183**, 6265-6273.

Turinsky, A. J., Moir-Blais, T. R., Grundy, F. J. & Henkin, T. M. (2000). *Bacillus subtilis ccpA* gene mutants specifically defective in activation of acetoin biosynthesis. *J Bacteriol* **182**, 5611-5614.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0034.

VanGuilder, H. D., Vrana, K. E. & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* **44**, 619-626.

Vendittelli, F., Santonocito, C., Paradisi, A., Romitelli, F., Concolino, P., Silveri, S.L., Sisto, T., Capizzi, R., Catricala, C., Mule, A., Di Carlo, A., Zuppi, C., Capoluongo, E. (2009). A new standardized absolute quantitative RT-PCR method for detection of tyrosinase mRNAs in melanoma patients: technical and operative instructions. *Clin Chim Acta* **409**, 100-105.

Vijgen, L., Keyaerts, E., Moes, E., Maes, P., Duson, G. & Van Ranst, M. (2005). Development of one-step, real-time, quantitative reverse transcriptase PCR assays for absolute quantitation of human coronaviruses OC43 and 229E. *J Clin Microbiol* **43**, 5452-5456.

Wang, E., Bauer, M. C., Rogstam, A., Linse, S., Logan, D. T. & von Wachenfeldt, C. (2008). Structure and functional properties of the *Bacillus subtilis* transcriptional repressor Rex. *Mol Microbiol* **69**, 466-478.

Warner, J. B. & Lolkema, J. S. (2003). CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 475-490.

Weickert, M. J. & Chambliss, G. H. (1990). Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6238-6242.

Weickert, M. J. & Adhya, S. (1992). A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J Biol Chem* **267**, 15869-15874.

Wendisch, V. F., Bott, M., Kalinowski, J., Oldiges, M. & Wiechert, W. (2006). Emerging *Corynebacterium glutamicum* systems biology. *J Biotechnol* **124**, 74-92.

Whatmore, A. M., Chudek, J. A. & Reed, R. H. (1990). The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* **136**, 2527-2535.

Wolstencroft, K., Owen, S., du Preez, F., Krebs, O., Mueller, W., Goble, C. & Snoep, J. L. (2011). The SEEK: a platform for sharing data and models in systems biology. *Methods Enzymol* **500**, 629-655.

Wong, M. L. & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* **39**, 75-85.

Wray, L. V., Jr., Pettengill, F. K. & Fisher, S. H. (1994). Catabolite repression of the *Bacillus subtilis hut* operon requires a *cis*-acting site located downstream of the transcription initiation site. *J Bacteriol* **176**, 1894-1902.

Yoshida, K., Kobayashi, K., Miwa, Y., Kang, C.M., Matsunaga, M., Yamaguchi, H., Tojo, S., Yamamoto, M., Nishi, R., Ogasawara, N., Nakayama, T., Fujita, Y. (2001). Combined transcriptome and proteome analysis as a powerful approach to study genes under glucose repression in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **29**, 683-692.

Yun, J. J., Heisler, L. E., Hwang, II, Wilkins, O., Lau, S.K., Hyrcza, M., Jayabalasingham, B., Jin, J., McLaurin, J., Tsao, M.S., Der, S.D. (2006). Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **34**, e85.

Zeigler, D. R., Pragai, Z., Rodriguez, S., Chevreux, B., Muffler, A., Albert, T., Bai, R., Wyss, M. & Perkins, J. B. (2008). The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains. *J Bacteriol* **190**, 6983-6995.

7 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
A_{xxx}	Absorption von bei einer Wellenlänge von xxx nm
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BCAA	verzweigtkettige Aminosäuren
bla	Resistenz-vermittelndes Gen gegen Ampicillin (β-Lactamase)
β-ME	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaar
CAA	Casein, säurehydrolysiert
CAF	Ammoniumeisen(III)-citrat
Cm	Chloramphenicol
C_q	Quantifizierungszyklus der real-time PCR
DEPC	Diethylcarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Erm	Erythromycin
EtOH	Ethanol
Glk	Glukose
GTC	Guanidinthiocyanat

KbE	Koloniebildende Einheit
Km	Kanamycin
lacZ	Gen der β-Galaktosidase
LB	Luria-Bertani (Medium)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
OD_{600}	optische Dichte bei λ = 600 nm
ONPG	*o*-Nitrophenyl-β-galactopyranosid
ori	Replikationsursprung
PCR	Polymerasekettenreaktion
^{R}	Resistenz/resistent
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdecylsulfat
SysMO	Systems Biology of Microorganisms (Systembiologie-Projekt)
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	Über Nacht
ÜTK	Über-Tag-Kultur
VK	Vorkultur
WT	Wildtyp

Einheiten

° C	Grad Celsius
g	Gramm
h	Stunde
J	Joule
l	Liter
m	Meter
M	Molar
min	Minute
s	Sekunde
U	Einheiten der Enzymaktivität
V	Volt
W	Watt

Nukleotide

A	Adenosin
C	Cytidin
G	Guanosin
T	Thymidin
U	Uracil
W	A oder T
R	G oder A
S	C oder G
Y	C oder T
N	A, C, G, T

Vorsätze

k	kilo (10^{3})
m	milli (10^{-3})
µ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
p	piko (10^{-12})
f	femto (10^{-15}

Versicherung an Eides statt

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Erlangen, den 21.12.2011 ________________________________

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass das vorliegende Schriftstück noch keiner anderen Prüfungsstelle vorgelegen hat und ich mich nicht in Erlangen oder anderswo ohne Erfolg einer Promotionsprüfung unterzogen oder zu promovieren versucht habe.

Erlangen, den 21.12.2011 ________________________________